

**Differierende Zytokinantwort in humanen Vollblutproben  
nach Stimulation mit Lipopolysaccharid  
unterschiedlicher Bakterienstämme**

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Eva Maria Steinringer  
aus Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Günther Mathiak
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Minor

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.10.2007

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. D.C. Wirtz

**Meiner Familie  
gewidmet**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Fragestellung .....	9
1.2 Sepsis .....	11
1.2.1 Definition .....	11
1.2.2 Pathophysiologie .....	12
1.3 Bakteriämie und Endotoxämie .....	14
1.4 LPS - Historie .....	14
1.4.1 LPS - Aufbau und Struktur .....	15
1.5 Wirkungsmechanismen des „PAMP“ LPS .....	17
1.5.1 Toll-like-Rezeptoren .....	18
1.5.2 Das Adaptermolekül MyD88 und der von ihm abhängige Signalweg .....	19
1.5.3 Scavenger Rezeptoren .....	20
1.6 Mediatoren .....	21
1.6.1 Zytokine und Chemokine .....	21
1.6.2 Zusammenstellung der untersuchten Mediatoren .....	23
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.2 Versuchsaufbau .....	24
2.3 Prinzip der ELISA-Untersuchung .....	25
2.4 Messung der Serum-Zytokine und -Chemokine mit Sandwich-ELISA .....	26
2.5 Statistische Analyse .....	28
2.6 Graphiken und Abbildungen .....	28
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Effekte von geringen Dosen LPS auf die Zytokin-Produktion in Vollblut ..</b>	<b>29</b>
3.1.1 TNF- $\alpha$ -Produktion über 24h .....	29
3.1.2 IL-1 $\beta$ -Produktion über 24h .....	31

3.1.3	IFN- $\gamma$ -Produktion über 24h.....	32
3.1.4	IL-10-Produktion über 24h.....	34
3.1.5	MCP-1-Produktion über 24h.....	35
<b>3.2</b>	<b>Dosis-Effekt von LPS auf die Zytokin-Produktion in Vollblut-Proben .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	TNF- $\alpha$ -Produktion bei zunehmender LPS-Dosis .....	37
3.2.2	IL-1 $\beta$ -Produktion bei zunehmender LPS-Dosis .....	38
3.2.3	IFN- $\gamma$ -Produktion bei zunehmender LPS-Dosis .....	40
3.2.4	IL-10-Produktion bei zunehmender LPS-Dosis .....	41
3.2.5	MCP-1-Produktion bei zunehmender LPS-Dosis .....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenstellung der Diagramme .....</b>	<b>56</b>
6.1	Zeit-Diagramme 7-11 .....	56
6.2	Dosis-Diagramme 12-16 .....	57
6.3	Diagramm-Legende .....	58
<b>7</b>	<b>Zusammenstellung der Rohdaten .....</b>	<b>60</b>
7.1	Zeit-Werte-Tabelle .....	60
7.2	Dosis-Werte-Tabelle .....	61
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

ACTH	adrenocorticothropes Hormon
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BPI	bakterizides permeabilitätssteigerndes Protein
CISF	Cytokine synthesis inhibitory factor, IL-10
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung, Verbrauchskoagulopathie
dOcla	3-deoxy-D-manno-octulosonic-Säure
DZ	Dendritische Zelle
FBS	Fetal Bovine Serum, fetales Kälber-Serum
HZV	Herz-Zeit-Volumen
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül, "intracellular adhesion molecule"
Ig	Immunglobulinen
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
KDO	2-keto-3-deoxyoctulosonic-acid
L, D-Hep	L- oder D-glycero-D-manno-heptose
LFA	Leukozytenintegrin "Lymphocyte function-associated antigen"
LPS	Lipopolysaccharid
MAL	MyD88-adaptor-like
MAPK	mitogen aktivierte Protein-Kinasen
MHC	„major histocompatibility complex“- Moleküle
MODS	Multiples-Organ-Dysfunktions-Syndrom
MyD88	Myeloid-Differenzierungs-Faktor-88

NO	Stickstoffmonoxyd
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	„pathogen-associated molecular patterns“
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
PRR	„pattern recognition receptors“ (Muster Erkennungsrezeptoren)
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SR	Scavenger-Rezeptoren
T4Fc	Flagmrs TLR4-hulgGFc
TIRAP	Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne enthaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domaine – containing adaptor inducing IFN- $\beta$



# 1 Einleitung

---

## 1.1. Fragestellung

Trotz einer deutlichen Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten, stellen Sepsis, SIRS und septischer Schock weiterhin die Haupttodesursachen auf nicht kardiologischen Intensivstationen weltweit dar (Angus et al., 2001). Eine Senkung der Mortalität bei septischen Patienten konnte in den letzten Jahren lediglich durch supportive intensivmedizinische Maßnahmen, wie zum Beispiel die Anpassung der Beatmungsstrategien bei Acute-Respiratory-Distress-Syndrom (ARDS) oder dem frühzeitigem Einsatz von Hämodialyse bei akutem Nierenversagen (ANV), erreicht werden. Die immunologischen Vorgänge konnten aber nicht direkt beeinflusst werden, obwohl die Vorgänge innerhalb des Immunsystems immer genauer erforscht werden (Friedman et al., 1998).

Von einigen zu Beginn vielversprechenden Ansätzen, fanden jedoch nur die Ergebnisse der PROWESS-Studie im klinischen Alltag eine Anwendung durch den Einsatz des Medikamentes Xigris®. In jüngster Vergangenheit, wurde durch die ADDRESS-Studie jedoch gezeigt, dass auch diese Therapie nicht universell wirksam und einsetzbar, ja sogar mit erheblichen Risiken verbunden ist.

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine Therapie, welche die überschießende Entzündungsreaktion am Beginn der Immunreaktions- Kaskade nachhaltig steuern kann und somit frühzeitig Schäden verhindert.

Im Rahmen der gram-negativen Sepsis besteht eine Endotoxinämie. Ein Bestandteil von gram-negativen Bakterien ist Lipopolysaccharid (LPS). Es wird als Pathogen vom angeborenen Immunsystem erkannt woraufhin es zu einer spezifischen Immunantwort kommt.

Das Verständnis von der Pathophysiologie der Sepsis wird als Schlüssel zu Diagnostik- und Therapieansätzen gesehen. Aus diesem Grund sind Endotoxinämie - Modelle häufig Gegenstand der Grundlagenforschung.

Vielversprechende Ansatzpunkte stellen die Mediatorstoffe der Zellkommunikation, die Zytokine und Chemokine dar. Diese Stoffe koordinieren eine Vielzahl von Reaktionen im Organismus.

Am Beginn der Immunantwort steht eine Infektion mit Bakterien, Pilzen, Viren oder Protozoen bzw. deren Bestandteilen.

Um in die Sepsis-Kaskade zu therapeutischen Zwecken gezielt eingreifen zu können, sind deren Signalwege Ansatzpunkte der Forschung.

Bei der Literaturrecherche zum Thema Lipopolysaccharid und Sepsis fällt auf, dass es wenig grundlegenden Studien gibt, die einzelne Lipopolysaccharid (LPS)-Derivate verschiedener Bakterienstämme miteinander in ihren Effekten auf einzelne Zytokine und Chemokine vergleichen. Hinzu kommt die Tatsache, dass immer wieder LPS-Sorten unterschiedlicher Bakterienstämme in den Studien verwendet werden, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse erschwert wird.

Zudem wird in Studienmodellen die Frage, welches Bakterienderivat am besten geeignet ist, oft vernachlässigt. Es hat sich jedoch bereits gezeigt, dass die Endotoxine verschiedener Bakterien-Stämme unterschiedliche Effekte zeigen können.

In einem Letalitäts-Modell über Endotoxämie von TNF und LT double Knock-Out Mäusen überlebten alle Tiere (n=10) nach intraperitonealer Applikation von 2 mg LPS des Bakteriums *Escherichia coli*. Bei der gleichen Dosis LPS von *Salmonella typhosa* hingegen starben alle Tiere (Netea et al.2001).

Tatsächlich findet sich ein unerklärter Widerspruch in der Literatur. Trotz des scheinbar protektiven Effektes von neutralisierenden, monoklonalen anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern reagierten TNF- $\alpha$ - oder TNF- $\alpha$  Knock-Out Mäuse in Studien mit LPS von *Escherichia coli* sehr empfindlich auf den tödlichen Effekt von LPS (Beutler et al.,1985; Bagby et al.,1991; Tracy et al.1987; Zanetti et al.,1992).

Der Grund für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte die tatsächliche Quelle der LPS-Provokation sein, der Bakterienstamm.

Die vorliegende Ex-vivo Studie untersucht zum einen die generelle Stimulationsfähigkeit von Lipopolysacchariden verschiedener Bakterienstämme auf repräsentative Zyto- und Chemokine und zum anderen den zeitlichen Verlauf sowie die Dosisabhängigkeit.

Die Ergebnisse wurden bereits 2002 im Rahmen der 25. Conference on Shock Big Sky, Montana als Postersitzung demonstriert und 2003 im International Journal of Molecular Medicine veröffentlicht (Mathiak et al., 2003).

Möglicherweise lassen sich Studien, die unterschiedliche Lipopolysaccharid-Arten verwenden, nicht miteinander vergleichen. Eine genauere Darstellung der Expressionskinetik von Zytokinen und Chemokinen kann bei der klinischen Frühdiagnostik und Therapie der Sepsis hilfreich sein, da das Verständnis der Funktionswege des Immunsystems unabdingbar für spätere Ansatzpunkte im Rahmen der Entwicklung und klinischen Anwendung von Medikamenten ist. Diese Medikamente setzen auf molekularer Ebene an und können die Richtung der Reaktionskaskade verändern.

## **1.2. Sepsis**

### **1.2.1 Definition**

Das Wort 'Sepsis' kommt aus dem Griechischen und bedeutet Fäulnis.

Die Sepsis ist die lebensbedrohliche Verlaufsform einer Infektion, die von Bakterien, Pilzen, Viren oder Protozoen ausgelöst wird.

Diese kann durch Wanderung des Erregers, aber auch von begrenzten lokalen Infektionen ausgehen (Krause und Gubler, 1999). Es kommt im infizierten Organismus zu überschießenden Reaktionen mit einer Aktivierung endogener Entzündungsmediatoren.

Nachdem verschiedene Stadien durchlaufen werden, kann diese spezielle Form der Infektion in einem Schock mit irreversiblen Kreislauf- und Organversagen enden.

Bis 1991 existierte keine einheitliche Nomenklatur und Definition der Sepsis, was den Umgang mit diesem Krankheitsbild erschwerte.

Aus diesem Grund legte in den USA die Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine 4 Stadien der Sepsis mit fließendem Übergang fest.

Anhand klinischer Aspekte, sowie patho-physiologisch zeitgemäßem Verständnis wird Sepsis definiert als:

1. ein klinisches Syndrom
2. eine durch Infektion ausgelöste, systemische, inflammatorische Reaktion,
3. die durch kontinuierliche oder periodische, von einem Herd ausgehende Invasion pathogener Mikroorganismen oder
4. deren toxischer Produkte verursacht wird sowie
5. durch die Produkte der inflammatorischen Reaktion unterhalten werden kann und
6. entweder zum Überwinden der Infektion oder zum Tod des Wirtsorganismus durch Multiorganversagen führt.

### 1.2.2. Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Sepsis sei hier am Beispiel von gram-negativen Bakterien dargestellt, da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich gram-negative Bakterienstämme verwandt wurden. Im Falle der gram-negativen Bakterien wird durch mikrobielle Zellwandbestandteile, den sogenannten Endotoxinen (Lipopolysaccharide, LPS), eine Entzündungskaskade ausgelöst (Abbildung 1).

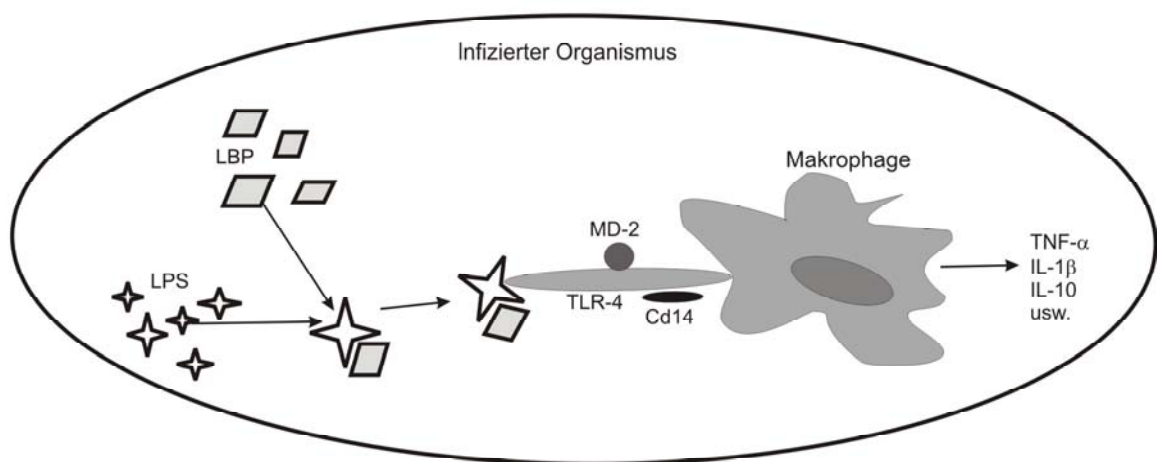


Abbildung 1: Beginn der Entzündungskaskade nach der Infektion des Organismus mit LPS

Es findet eine Aktivierung des Komplementsystems innerhalb des Gerinnungssystems und Entzündungszellen statt. Initial spielen die Makrophagen eine bedeutsame Rolle. Über diese drei Wege kommt es unter anderem zur Ausschüttung von Prostaglandinen und Leukotrienen, Endothelin und Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Es kommt in der Folge zu einer Endothelschädigung der Gefäße, die verantwortlich ist für eine Zunahme der Gefäßpermeabilität (leaking) und durch Veränderungen im Gerinnungssystem zur Entstehung von Mikrothromben (Abbildung 2). Hinzu kommen Veränderungen des Gefäßtonus. Die Permeabilitätszunahme bewirkt ein so genanntes „capillary leak“, d.h. es kommt zu einer Flüssigkeitsverschiebung ins Interstitium; der Tonusverlust der Arteriolen bewirkt eine Senkung des Blut- und Perfusionsdruckes und die lokale Vasokonstriktion sowie die Eröffnung von arterio-venösen-Shunts führen zu einer ungenügenden Durchblutung der Organe. Zytokine wie TNF- $\alpha$  führen zudem über den Hypothalamus zu Fieber und wirken hemmend auf die Myokard-Kontraktilität, wodurch die Zirkulation noch weiter eingeschränkt wird.

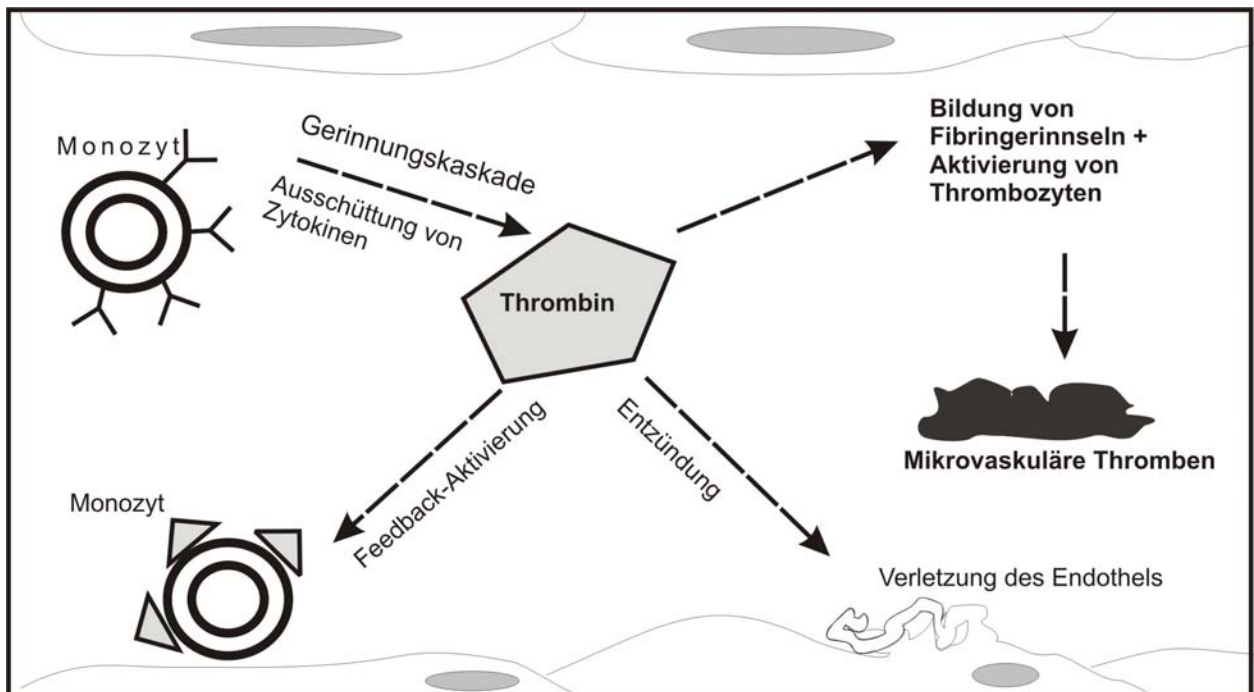


Abbildung 2: Entstehung von mikrovaskulären Thromben

### 1.3. Bakteriämie und Endotoxämie

In der vorliegenden Arbeit werden nicht die Zytokin-Reaktionen bei Sepsis im eigentlichen Sinne untersucht, sondern es handelt sich um eine Bakteriämie bzw. um eine Endotoxämie, da es nicht zu einer konstanten oder periodischen Vermehrung von Bakterien und deren Ausschwärmen in die Blutbahn kommt, wie dies bei einer Sepsis der Fall ist.

Bei einer Bakteriämie handelt es sich definitionsgemäß vielmehr um ein „vorübergehendes Vorhandensein von Bakterien im Blut, wobei es (...) weder zur Vermehrung der Bakterien im Blut noch zur Absiedlung der Infektion in andere Organe kommt“ (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Auflage 257).

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurden zudem keine vollständigen Bakterien benutzt, sondern nur Membranbestandteile, das Endotoxin LPS. Es handelt sich also um ein Endotoxämie-Modell. Dieses Modell bietet sich für die Grundlagenforschung der Sepsis an, da das Augenmerk auf einen bestimmten Fokus gerichtet ist. So kann gezielter untersucht werden, wie die Zytokine auf verschiedene Endotoxine und konsekutiv auf verschiedene Bakterienstämme reagieren.

### 1.4. Lipopolysaccharid (LPS)- Historie

Richard Pfeiffer (1858-1910), ein Mitarbeiter des Robert-Koch-Institutes für Infektionskrankheiten in Berlin, untersuchte bereits vor 100 Jahren die Toxin-Schock auslösenden Eigenschaften von Cholera Bakterien bei Meerschweinchen.

Der Wissenschaftler stellte die Theorie auf, dass es einen hitzestabilen Auslöser innerhalb der Bakterienzelle geben müsse, und bezeichnete diesen als „Endotoxin“, um ihn von dem bereits bekannten Exotoxin zu unterscheiden.

Etwa zur gleichen Zeit begann der amerikanische Forscher William B. Coley (1862-1936) am Memorial Hospital in New York, Patienten mit inoperablen Sarkomen mit einer Mischung aus lebenden und später auch abgetöteten gram-negativen *Serratia marcescens*-Stämmen und gram-positiven Streptokokken zu behandeln. Diese

Behandlung zeigte jedoch oft bei den behandelten Patienten starke Nebenwirkungen mit hohem Fieber und Schockreaktionen. Trotzdem führte diese Impfung, die als „Coley`s toxin“ bezeichnet wurde, zur Remission der Tumore.

Ähnliche Effekte beobachtete auch Hans Buchner aus München an Tiermodellen. Als Reaktion beobachtete er zudem eine Stärkung des Immunsystems.

Heute ist es nachgewiesen, dass diese Effekte durch Lipopolysaccharide (LPS) in der Bakterienwand hervorgerufen wurden.

In den 40-er und 50-er Jahren wurden als Erstes die LPS-Sorten von *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* von Otto Westphal, Otto Lüderitz und Fritz Bister vollständig erforscht (Alexander und Rietschel, 2001).

#### **1.4.1. LPS - Aufbau und Struktur**

Die Zellwand gram-negativer Bakterien setzt sich aus mehreren Schichten zusammen.

Die Schichten bestehen, von innen nach außen betrachtet, aus der Zytoplasmamembran und einer darauf liegenden, dünnen Murein-Schicht. Darauf folgt ein periplasmatischer Raum, in dem sich Murein-Lipoproteine befinden, die die Murein-Schicht mit der äußeren Membran verbinden.

Eng aneinander liegende Lipopolysaccharide (LPS) sind ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran verschiedener gram-negativer Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* und *Neisseria meningitidis*. Lipopolysaccharide (LPS) sind äußerst starke Stimuli des Immunsystems. Sie entfalten über so genannte Toll-like Rezeptoren und CD14 Rezeptoren ihre Wirkung.

Lipopolysaccharide sind extrem hitzestabile, amphiphile Moleküle, die mit einer lipophilen Region, dem sogenannten Lipid A und einer hydrophilen Poly- oder Oligosaccharid-Region verknüpft sind.

Der nach außen gerichtete Anteil der äußeren Membran besteht hauptsächlich aus dem Lipid A-Anteil, der ca. 75% der gesamten Membrandicke ausmacht und zudem eine hervorragende Schutzbarriere darstellt. Der innere Teil wird vornehmlich von Phospholipiden und Porinen gebildet.

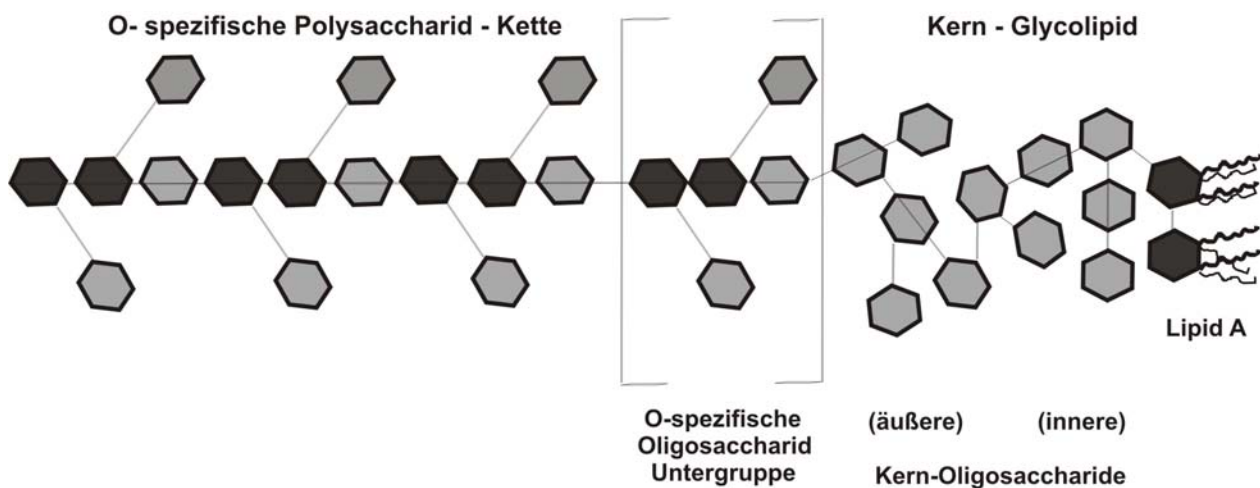


Abbildung 3: Lipopolysaccharid (LPS)-Struktur, Endotoxin gram-negativer Bakterien

Wie die Abbildung 3 zeigt, besteht das LPS gram-negativer Bakterien aus einer Poly- oder Oligosaccharid-Domäne am terminalen Ende des Moleküls. Diese Domäne wird nochmals aufgeteilt in die O-spezifische Kette, bestehend aus mehr als 50 sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, die sich wiederum in zwei bis acht Monosaccharid-Gruppen teilen, die sehr artspezifisch sind. An diesem Teil des LPS-Moleküls bestehen die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen.

Bakterien können nur mit dieser O-spezifischen Kette überleben, da sie die Bakterien vor Phagozytose und Angriffen des Immunsystems schützt. Hier ergibt sich ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer medikamentöser Möglichkeiten zur Bekämpfung von Infektionen.

Der zweite Teil des Polysaccharidschwanzes besteht aus der so genannten „Core Region“, die wiederum in ein „outer core“ und ein „inner core“ unterteilt wird.

Der „outer core“ setzt sich vornehmlich zusammen aus Hexosen wie z.B. D-Glukose, D-Galaktose, D-Glukosaminen und N-Acetylglucosaminen oder N-Acetylgalaktosaminen.

Der innere Teil, der dem Lipid A benachbart liegt, besteht bei den meisten gram-negativen Bakterien aus den charakteristischen Monosaccharid-Einheiten 3-deoxy-D-manno-octulosonic-Säure (dOcla), oder auch 2-keto-3-deoxyoctulosonic-acid (Kdo) genannt, und L- oder D-glycero-D-manno-heptose (L, D-Hep).



Die Zuckersäure Kdo ist der charakteristische und essentielle Hauptbestandteil der „inner core“-Region des bakteriellen LPS. Zudem wird er als diagnostischer Marker für LPS angesehen, an dem antibakterielle Substanzen ansetzen können, um die LPS-Biosynthese zu blockieren.

An die „inner core“-Region schließt sich das Lipid A an, das im eigentlichen Sinne für die endotoxischen Eigenschaften des LPS verantwortlich ist. Bereits 1954 wurde dies von Westphal und Lüderitz postuliert. Nachdem herausgefunden wurde, dass die R-Form des LPS von Bakterienmutanten, die lediglich aus Lipid A und Kdo besteht, die volle endotoxische Aktivität aufweist, konnte diese These weiter untermauert werden.

1975 konnte Galanos dann nachweisen, dass isoliertes Lipid A ebenso starke toxische Aktivität zeigt wie vollständige LPS-Präparate.

1983 gelang es nach vielen Studien, das Lipid A von *E. coli* und *S. enterica* vollständig darzustellen.

Lipid A besteht aus einer zentralen  $\beta(1\rightarrow6)$ -verbundenen D-Glukosamin-Disaccharid Einheit, die an Position 1  $\alpha$ -glykosidal bzw. an Position 4 über eine Esther-Verbindung mit Phosphat-gruppen verbunden ist.

Auf dieser Grundlage gelang es Shiba und Kusumoto 1984 zum ersten Mal, *Escherichia coli*-Lipid A vollständig synthetisch herzustellen.

In den folgenden Jahren konnten die LPS-Strukturen vieler gram-negativer Bakterien untersucht und dargestellt werden (Alexander und Rietschel, 2001).

### **1.5. Wirkungsmechanismen des „PAMP“ LPS auf der Ebene des angeborenen Immunsystems**

Wird ein Organismus von gram-negativen Bakterien infiziert, übt deren Endotoxin LPS als stärkster bekannter Stimulus des Immunsystems seine Wirkung auf die Zelle in folgender Weise aus: Es geht eine Verbindung mit einem LPS-Bindungsprotein (LBP) und dem membrangebundenen CD14 Antigen ein. CD14 wird von Monozyten, membranständigen Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Dieser Komplex benötigt dann noch einen weiteren Rezeptor um sein Signal transmembranär in das Zellinnere weitergeben zu können.

Dieser Rezeptor-Typ wird als „Toll like Rezeptor“ bezeichnet und in Form des Toll like Rezeptors 4 (TLR4) von Janeway CA et al. 1997 erstmals identifiziert (Janeway et al., 1997).

### **1.5.1. Toll like Rezeptoren (TLR)**

Das Protein „Toll“ ist ein Transmembran Rezeptor der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der im Rahmen der angeborenen Immunität der Fliege an der Abwehr gegen Bakterien und Pilze beteiligt ist. Diesem Rezeptor entsprechend gibt es nun bei Vertebraten die „Toll like“ Rezeptoren, die in vergleichbarer Weise Signalkaskaden im Rahmen der mikrobiellen Abwehr aktivieren.

Toll like Rezeptoren nehmen eine wichtige Schlüsselposition bei der Signalübertragung ins Zellinnere ein.

Es wurden bereits 13 Mitglieder dieser Familie charakterisiert (Tabeta et al., 2004).

Die Toll like Rezeptoren 1, 2 und 4 (TLR1, TLR2, TLR4) sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Andere hingegen liegen in intrazellulären Kompartimenten (z.B. TLR7 und TLR9) (Takeda et al., 2003).

Eine Vielzahl unterschiedlicher mikrobieller Bestandteile viraler oder bakterieller Herkunft bilden die Liganden für die einzelnen Mitglieder dieser Rezeptoren-Familie.

Die Toll like Rezeptoren sind Typ I integrale Membran-Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 90-115 kDa.

Das Lipopolysaccharid- Bindungsprotein (LBP) katalysiert den Transfer des LPS zur Bindung an membrangebundene CD14-Zellen. CD 14 ist ein 55kDa großes Glykoprotein, dem das carboxyterminale Ende fehlt. Es ist damit nicht zu einer intrazellulären Signaltransduktion fähig. Es entsteht eine funktionelle Einheit zwischen dem CD14 Rezeptor und dem Toll like Rezeptor 4 (TLR 4).

Ein weiteres Molekül geht ebenfalls einen Bindungskomplex mit TLR4 ein, der Kofaktor MD-2. So entsteht ein multimerer Erkennungskomplex.

MD-2 ist ein Cystein reiches Glykoprotein, welches 1999 von Shimazu et al. entdeckt wurde. Seine drei bekannten Glykoformen haben ein Molekulargewicht zwischen 20 und 30kDa. Es ist nur in seiner monomeren Form biologisch aktiv und besitzt

Chaperoneigenschaften in Verbindung mit TLR 4 (Shimazu et al, 1999 ; Re und Stromminger, 2002).

Über eine intrazelluläre, 150 Aminosäuren große TIR-Domäne (Toll-IL-1R-Domäne) findet die Signalvermittlung nach intrazellulär über eine Dimerisierung des Rezeptors statt und eine Signalkaskade wird aktiviert. Im Zellinneren sind dann bislang zwei hauptsächliche Signalwege für die LPS-Wirkung erforscht und in Einzelheiten beschrieben. Beide Wege sind an ein Adaptermolekül, den sogenannten „Myeloid-Differenzierungs-Faktor-88“ (MyD88) gebunden.

### **1.5.2. Das Adaptermolekül MyD88 und der von ihm abhängige Signalweg**

Ist die Dimerisierung des Rezeptors erfolgt, kommt es zur Rekrutierung des TIR-Domänen tragenden Adaptermoleküls „Myeloid-Differenzierungs-Faktor-88“ (MyD88).

MyD88 ist ein bimolekulares Protein, welches aus einer aminoterminalen „Death-Domäne“ (DD) und einer carboxyterminalen Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)- Domäne besteht.

Der weitere Weg führt dann über die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) und den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF-6).

Ab hier teilt sich der Weg auf. Die erste Möglichkeit des weiteren Verlaufs besteht in der Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinasen mit konsekutiver Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B. Nach Lösung von inhibitorisch wirksamem I $\kappa$ B kommt es zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Dort folgt dann die Transkription verschiedener proinflammatorischer und regulatorischer Gene mit konsekutiver Ausschüttung einer bestimmten Zytokin-Zusammensetzung.

An dieser Stelle gibt es auch einen inhibitorischen Regulationsmechanismus in Form des in Monozyten und Makrophagen selektiv exprimierten „IRAK-M“. IRAK-M wird nach der Toll like Rezeptor- Stimulation verstärkt exprimiert und verhindert eine Dissoziation von IRAK und MyD88 und somit die Bildung des IRAK/TRAF-6-Komplexes. Der nachfolgende Weg ist unterbrochen.

Die zweite mögliche Signalabfolge führt über die Stimulation von Mitgliedern der „mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen“- Familie (MAP-Kinasen) und der Transkriptions-

faktoren „jun“ und „fos“ zur gewünschten Immunantwort (Takeda und Akira, 2004; Alexander und Rietschel, 2001; Muzio et al., 1998).

Abbildung 4 verdeutlicht diese Reaktionen.

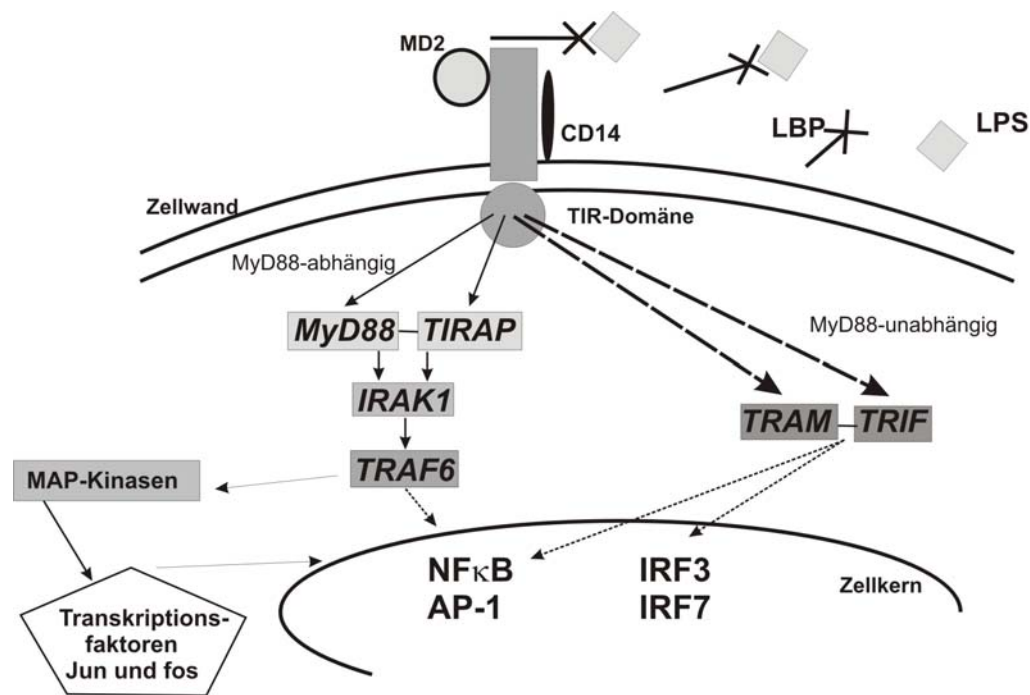


Abbildung 4: Signaltransduktion durch Toll like Rezeptor 4

### 1.5.3. Scavenger-Rezeptoren

Das Immunsystem hält noch weitere Möglichkeiten zur Abwehr von LPS bereit, die zum Beispiel die Wirkung auf die Zelle verhindern.

Wie von Hampton et al. 1991 beschrieben, ist Lipid A in der Lage, an so genannte „Scavenger-Rezeptoren (SR)“ der Klassen A zu binden. Diese Rezeptoren sind „Abfangjäger“ für LPS. Die LPS Aufnahme durch die Zelle wird so vermindert.

SR-A Rezeptoren sind trimere transmembrane Glycoproteine, die von Makrophagen, Leberzellen und Endothelzellen exprimiert werden und zudem durch Lipopolysaccharide direkt stimuliert werden. Sie bestehen aus drei extrazellulär gelegenen c-terminal endenden, cystein-reichen Domänen, die Bindungsstellen für LPS darstellen. Die Zellwandverankerung erfolgt über einen langen, kollagenartigen Teil.

Derzeit sind drei Arten von SR-A bekannt: SR-A1, SR-A2 und SR-A3.

Es könnte zudem sein, dass SRs nicht nur LPS abfangen, sondern dass die Bindung LPS-SR auch zu einer Ausschüttung von IL-1 führt, unter Umgehung des CD14-TLR Signalweges (Miller und Krangel, 1992).

## **1.6. Die Mediatoren**

### **1.6.1. Zytokine und Chemokine**

Zytokine und Chemokine sind Entzündungsmediatoren, die von einer Vielzahl von Zellen auf unterschiedliche Stimuli hin gebildet und sezerniert werden und als intrazelluläre Mediatoren zur Aktivierung von weiteren Zellen beitragen (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Auflage 257).

Sie sind Gegenstand der Forschung in experimentellen und klinischen Studien in Bezug auf verschiedene Krankheitsbilder, einschließlich der Entzündung, der Sepsis und des ARDS (Dinarello, 1997; Luster, 1998).

Zu den ursprünglichsten pharmakologischen Stimuli für die Zytokinproduktion gehört das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS).

Durch Stresssignale wie Bestandteile von Mikroorganismen, ultraviolettes Licht, Hitzeschock oder Adhärenz an fremde Oberflächen kommt es über mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) zu deren Ausschüttung (a. Dinarello, 2000).

Sie besitzen eine gemeinsame Strukturbasis in Form von Aminosäuresequenzen oder der räumlichen Struktur, nach der sie in verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

Wie Bone R.C. 1991 beschreibt, können Zytokine erstaunlicherweise in Kombination andere Wirkungen zeigen als einzeln.

Eine weitere Unterteilung kann anhand der pro-inflammatorischen bzw. anti-inflammatorischen Eigenschaften vorgenommen werden, wobei bemerkt werden muss, dass viele Zytokine sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen aufweisen. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zählen Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) , Interleukin-1 (IL-1) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Interferon- $\gamma$  besitzt zwar auch antivirale Aktivität, hauptsächlich führt es jedoch zu einer Aktivierung von Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  und zur Synthese von Stickstoffmonoxyd (NO). Zu der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine gehören z.B. Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13).

Chemokine sind Mediatoren, die auf verschiedene Zellen chemotaktische Wirkung haben. Es wurden bereits ca. 50 verschiedene Chemokine entdeckt und untersucht (Baggiolini, 2001). Zu dieser Gruppe zählt zum Beispiel MCP-1.

### 1.6.2. Zusammenstellung der untersuchten Mediatoren

Kürzel	Weitere Bezeichnung	Genort	Struktur	Quelle	Zielzellen	Biol. Aktivität	Rezeptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Cachektin, Necrosin, Tumor necrosis factor	6p21.3	157 AA, 52 kDa (primär aus 17,4 kD-Einheiten)	akt. Monozyten u. Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten, T-Zellen, Fibroblasten	nahezu alle Körperzellen	proinflammatorisch, Wachstums-u. Differenzierungsfaktor für viele Zellen zytotoxisch für viele transformierte Zellen	Typ-I (CD120A) Typ-II (CD120B) Lösliche Rez. im Serum u. Urin
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	T-Zell-Interferon, Immuninterferon	12q24.1	143 AA, 40-70 kDa, Monomere von 20-25 kD bilden Di- oder Multimere	CD8+ und CD4+, T-Zellen, NK-Zellen	Hämatopoetische Zellen, Epithelzellen, Viele Tumorzellen	Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, EC verstärken antivirale Wirkung von IFN- $\alpha/\beta$	2 Ketten: eine Kette (CD119) mit hochaffiner Bindung von IFN- $\gamma$ , $\beta$ -Kette: akzessorisch für Signaltransduktion
<b>IL-10</b>	Cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)	1	160AA, 35-40 kDa	TH0- u. TH2-Zellen, akt. CD4+ u. CD8+ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DC	B-Zellen, Thymozyten, TH1-Zellen, Monozyten, NK-Zellen	Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, Thymozyten, Mastzellen	eine Kette, Homologie zu IFN- $\gamma$ u. IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Lymphocyte activating factor, endogenous pyrogen	2q12-21, 2q13-21	269 AA	Monozyten, Makrophagen, DC, Astrozyten, NK-Zellen, B-Zellen, EC, Fibroblasten	T-Zellen, B-Zellen, EC, Hepatozyten, Knochen	Lymphozyten- u. Makrophagen-Aktivierung, Erhöhung der Zelladhäsion, Fieber, Gewichtsverlust, Hypotonie, Akutphase-Reaktion	Typ-I-Rez.: CD121a mit 3 Ig-artigen Domänen, Typ-II-Rez: CD121 b mit 3 Ig-artigen Domänen, löslicher Rezeptor
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1, (MCAF)	17q11.2-q21	76 AA, 8-18 kDa	Epithelzellen, EC	Monozyten, T-Zellen, Basophile+ Eosinophile	Chemotaktische Wirkung auf Monozyten, aktiv. Monozyten+ Basophile	CC-CKR 2A, 2B,4

Tabelle1: Zusammenstellung der untersuchten Mediatoren und ihren Eigenschaften

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* Serotyp 0111:B4 (Lot 120K4063), *Salmonella typhosa* (Lot 60K4040), *Klebsiella pneumoniae* (Lot 58F4030) und *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 10 (Lot 100 K4063) wurden von der Firma Sigma Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, das Antibiotikum bzw. Antimykotikum RPMI, 1640L-Glutamin und die nicht essenziellen Aminosäuren von der Firma PAA Laboratories (Linz, Österreich).

Die Assey Dilution - Lösung wird mittels, durch Hitze inaktiviertes fetales Kälber-Serum (Lot AO 1221-291) und Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium (Lot F 01221-360) ebenfalls bei der Firma PAA hergestellt.

Die Vorratlösung für alle LPS-Stämme wurde mit 1mg/ml endotoxin-freien Wasser und 10-facher Verdünnung in derselben Pufferlösung hergestellt.

Die zur Messung verwendeten ELISA-Kits mit Antikörpern und Avidin-HRP- Reagenz werden von der Firma BD PharMingen hergestellt und von dort bezogen.

### 2.2. Versuchsaufbau

Für den Studienteil 3.1 und 3.2 stellten sich drei bzw. sechs gesunde, männliche Probanden zur Verfügung, denen jeweils 20ml Blut entnommen und sofort in heparinisierte Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verbracht wurde.

Die Zusätze für die heparinisierten Blutproben bestanden aus 60ml Antibiotika/Antimykotika RPMI-1640 mit Heparin (2,5 IU/ml), L-Glutamin und nicht-essenzieller Aminosäure.

Die Inkubation der Vollblut-Proben erfolgte daraufhin zusammen mit dem LPS-Träger (endotoxin-freies Wasser) und identischem Volumen von LPS-Verdünnung der verschiedenen Bakterienstämme über 0, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden bei 37°C, 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Die Inkubation der Kontrollgruppe mit Lösungsmittel.



Nach 0, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden bestand der nächste Schritt darin, 2,5 ml aus den Proben abzuziehen, bei 1500 G für 5 Minuten zu zentrifugieren und den klaren Überstand in Aliquotierungen zu je 0,5ml zu verteilen.

Die verteilten Proben wurden bis zur Messung mittels ELISA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Bestimmung der Zytokine und Chemokine erfolgte aus dem zellfreien Überstand mittels Sandwich-ELISA, nach Verteilung von jeweils 2,0 ml der aliquotierten Proben auf die 24 Loch-ELISA-Platten.

### 2.3. Prinzip der ELISA-Untersuchung

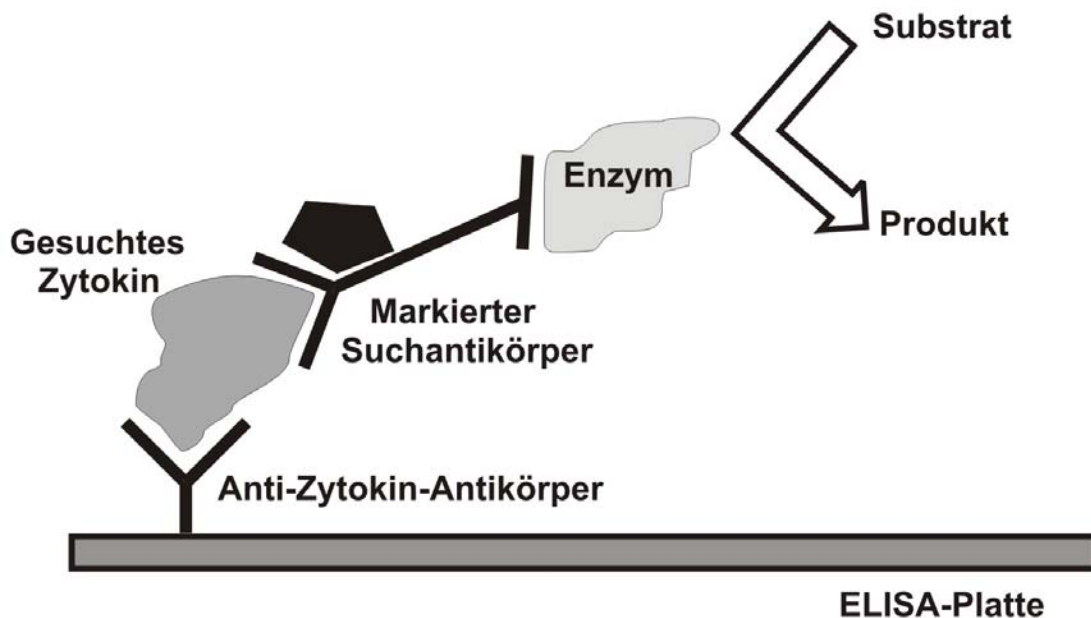


Abbildung 5: Prinzip des Enzyme-linked immunosorbent-assey (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent-assey (ELISA) ist eine quantitative analytische Methode, bei der ein Reaktionspartner enzymatisch markiert ist. Dieser kann entweder das Antigen, wie in diesem Fall, oder der Antikörper sein.

Eine Mikrotitrierplatte ist mit dem, zum gesuchten Antikörper korrespondierenden, Antigen beschichtet. Die im Serum vorhandenen Antikörper binden an das Antigen. Ein enzymatischer Sekundärantikörper bindet im nächsten Reaktionsschritt an die gesuchten Antikörper. Durch eine Farbreaktion wird Substrat umgewandelt und die

Quantität der Serumantikörper kann nach Erstellung einer Eichkurve mittels des mitgelieferten Standards korreliert werden.

Beim hier verwendeten Sandwich-ELISA ist der Antikörper für das gesuchte Antigen an die Titrierplatte gebunden. Die Menge des gebundenen Antigens aus der Probe wird durch die Zugabe eines markierten Zweitantikörpers ermittelt. Dieser bindet unter Bildung eines „Sandwiches“ an das Antigen (Abbildung 5).

#### **2.4. Messung der Serum-Zytokine und –Chemokine mit Sandwich-ELISA**

Die Proben wurden mit hochspezifischen ELISA-Kits für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-10 (IL-10), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und MCP-1 der Firma Becton Dickinson USA, gemessen.

Alle kalibrierten Kurven wurden von der Mess-Reaktivität der vom Hersteller rekombinierten Zytokinen/Chemokinen in PBS mit 10% FCS festgelegt.

Der Erkennungsbereich der ELISA-Kits entsprach den Befunden des Herstellers.

Die Herstellung und Verarbeitung der Proben erfolgt für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-10 (IL-10), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und MCP-1 nach folgender Anleitung:

Zunächst werden die Fänger-Antikörper des jeweiligen zumessenden Zytokins in Coating-Puffer-Lösung verdünnt. Die Coating-Puffer-Lösung besteht aus 8,4 g NaHCO<sub>3</sub> und 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Dieser Puffer hat einem pH Wert von 9,5.

Anschließend werden die ELISA-Platten mit 100 $\mu$ l der Fänger-Antikörper-Lösung (Capture Antibody) beimpft und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am Folgetag werden die Überstände aus den Plattenschächten entfernt und mit mindestens 300 $\mu$ l Wasch-Puffer dreimal gewaschen und anschließend auf Saugpapier ausgeschlagen.

Der Wasch-Puffer besteht aus 100ml 10 x Phosphate-Buffered Saline (PBS) mit 80g NaCl, 11,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g KCL und 1ml Tween 50% auf 1 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH Wert ist 7,0.

Nun müssen die einzelnen Plattenschächte mit mindestens 200 $\mu$ l Proben-Verdünnungslösung geblockt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Die Verdünnungslösung besteht aus 4,5ml 10x PBS und 5ml 10% Fetal Bovine Serum (FBS), ebenfalls mit destilliertem Wasser auf 50ml aufgefüllt. Der pH Wert ist ebenfalls 7,0.

Danach wird die Platte dreimal auf die übliche Weise gewaschen und auf Papier ausgeklopft.

Für die Herstellung der zu untersuchenden Standard-Proben müssen Verdünnungsreihen angefertigt werden.

Die bereits vorbereiteten und tiefgekühlten Proben werden bei Raumtemperatur schonend aufgetaut.

Es werden nun aus dem Stock 500pg/ml in ein Verdünnungsröhrchen gegeben. Dann werden jeweils 300µl entnommen und eine Verdünnungsreihe mit insgesamt sieben Röhrchen erstellt. auf diese Weise erhält man in den Tuben Proben-Konzentrationen in der absteigenden Reihenfolge von 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,25pg/ml, 15,63pg/ml und 7,8pg/ml, aufgefüllt mit Verdünnungslösung.

Die Kontroll-Gegenprobe enthält nur Verdünnungslösung.

Mit Hilfe einer Pipette werden nun 100µl jeder Probe und der Kontroll-Gegenprobe in die Plattenschächte gegeben, die Platten danach 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach fünfmal gewaschen. Hinzu kommt 100µl des jeweiligen Working Detector, bestehend aus dem jeweiligen Zytokin-Suchantikörper (Detection Antibody) und Avidin-HRP-Reagenz. Wiederum erfolgt die Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließendes siebenmaliges Waschen der Platten.

Zur endgültigen Messung der Konzentrationen wird nun auf die Platten jeweils 100µl Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin/Hydrogenperoxyd- Lösung) pro Schacht verteilt. Anschließend müssen diese für genau 30min in Dunkelheit gelagert werden. Die Zugabe von jeweils 50µl Stop-Lösung (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet die Reaktion und die Messung der vorhandenen Zytokin- Konzentration kann anhand des Farbausschlages im Spektrometer bei 450nm gemessen werden.

Die Präparation und Messung der ELISA-Platten für Interleukin-1β (IL-1β) erfolgt auf die ähnliche Weise. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass nach der Beimpfung der Platten mit den Proben, der Zytokin-Suchantikörper von der Avidin-HRP-Reagenz getrennt aufgebracht werden müssen.

Es entstehen zwei Arbeitsschritte, zwischen denen ein fünfmaliges Waschen erfolgt.

## **2.5. Statistische Analyse**

Die statistische Berechnung wurde mit Hilfe von SPSS 10.0 für Windows erstellt.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Als letzte statistische Differenzierung (LSD) folgt ANOVA, um die Mittel der Zytokin-Level zwischen den Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten genauso gut zu vergleichen wie die verschiedenen Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe.

P Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## **2.6. Graphiken und Abbildungen**

Die Verwendeten Abbildungen wurden mit Hilfe des Graphik- Programms

CorelDraw 11 für Windows, Version 11.633 der Firma Corel Corporation erstellt.

Die Ergebnisdiagramme wurden mit Microsoft Exel berechnet.

### 3 Ergebnisse

---

In der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen der Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-10 (IL-10) und MCP-1 in Vollblutproben nach Inkubation mit Lipopolysacchariden (LPS) von *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*, zum einen im zeitlichen Verlauf und zum anderen unter Dosissteigerung gemessen.

#### 3.1. Effekte von geringen Dosen LPS auf die Zytokin-Produktion in Vollblut

Der erste Teil der Versuchsreihe untersucht den zeitlichen Verlauf der Zytokinausschüttung über 24h nach Stimulation von Vollblut mit 10ng/ml LPS der verschiedenen Bakterienstämme. Gemessen wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 8, 12 und 24 h.

##### 3.1.1. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Produktion über 24h

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration zeigt nach Stimulation mit Lipopolysacchariden von *Escherichia coli* und *Salmonella thyphosa* einen raschen Anstieg, bis sie ihr Maximum bei etwa 8 bis 12h erreicht, um dann wieder abzusinken. Wie Abbildung 6 zeigt, liegen nach 24h die Konzentrationen bei ca. 51% (*Escherichia coli*) und 43% (*Salmonella thyphosa*) der Maximalwerte.

Nach Stimulation mit *Klebsiella pneumoniae* - LPS zeigt sich ebenfalls nach 8 bis 12h ein Konzentrationsmaximum. Zu diesem Zeitpunkt wurde lediglich die Hälfte an Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausgeschüttet (nach 12h: *Escherichia coli* stimulierte TNF- $\alpha$ :  $1257 \pm 229$  pg/ml; *Salmonella thyphosa* stimulierte TNF- $\alpha$ :  $1134 \pm 65$  pg/ml; *Klebsiella pneumoniae* stimulierte TNF- $\alpha$ :  $704 \pm 7$  pg/ml (  $p < 0,05$  vs. *Escherichia coli* und *Salmonella thyphosa*)).

Hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den LPS-Sorten von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*.

Ab dem Zeitpunkt 8h sinkt die Konzentration von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nach Stimulation mit *Klebsiella pneumoniae*-LPS über die nächsten 14h in weitaus geringerem Maße wieder ab (nach 24h noch 87% des Maximalwertes vorhanden) als bei *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* (noch vorhandene Konzentration zum Zeitpunkt 24h: *Escherichia coli* 52% des 12h Wertes; *Salmonella typhosa* 43% des 12h Wertes).

10 ng/ml *Pseudomonas aeruginosa*-LPS rief über 24h keinerlei Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Ausschüttung hervor.

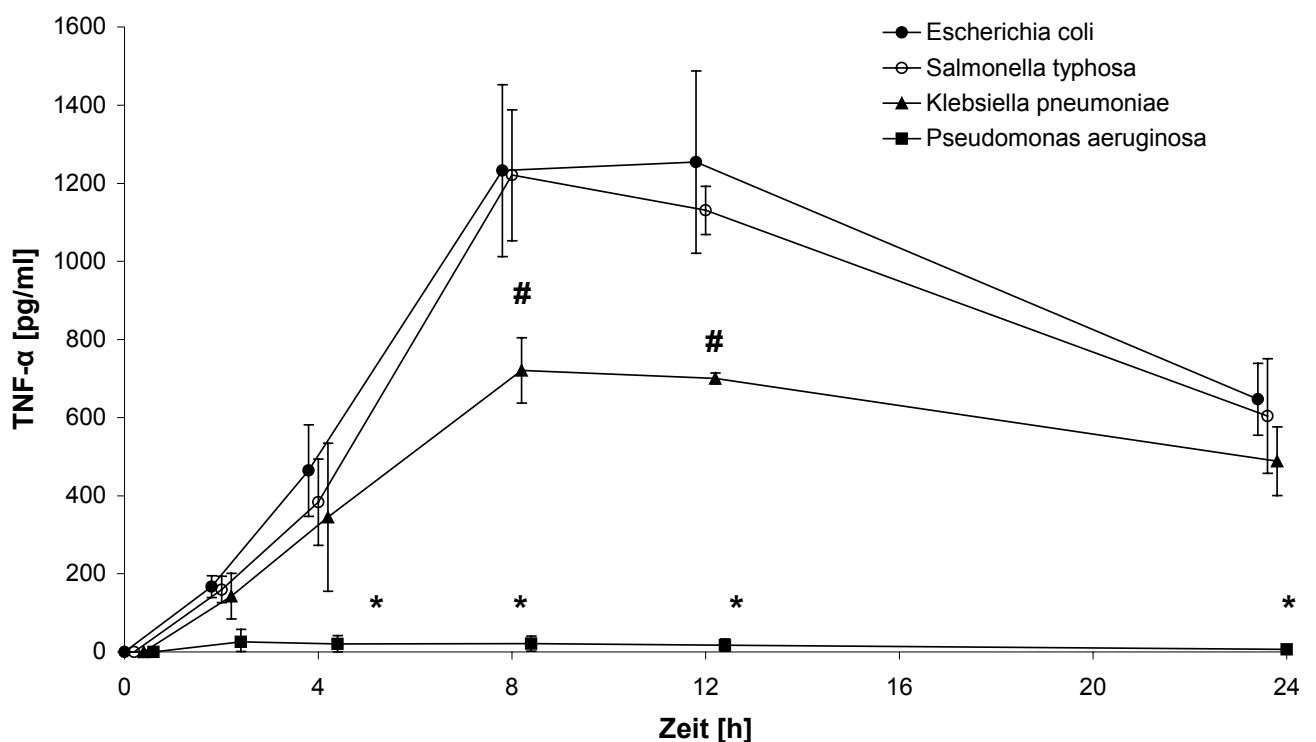


Abbildung 6: Auswirkung der verschiedenen LPS-Derivate auf TNF- $\alpha$  Ausschüttung in Vollblut-Proben über einen Zeitraum von 24h. \* kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zwischen *Pseudomonas aeruginosa*-LPS vs. die anderen Sorten, # kennzeichnet *Klebsiella pneumoniae*-LPS vs. alle anderen Sorten

### 3.1.2. Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) Produktion über 24h

Die Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Konzentration steigt nach etwa 4h durch die Stimulation von *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa* und *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysacchariden steil an. Das *Escherichia coli*- LPS zeigt hier die potenteste Wirkung. Ein Maximum wird bei allen drei Lipopolysaccharid-Sorten bei etwa 12h erreicht (*Escherichia coli* stimulierte Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ):  $619 \pm 112$  pg/ml; *Salmonella thyphosa* stimulierte:  $481 \pm 198$  pg/ml; *Klebsiella pneumoniae* stimulierte:  $472 \pm 100$  pg/ml).

Signifikante Unterschiede bestehen zwischen *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* zum Zeitpunkt 8h (*Escherichia coli*:  $480 \pm 153$  pg/ml; *Klebsiella pneumoniae*:  $296 \pm 75$  pg/ml).

Die Konzentrationen fallen langsam über die nächsten 12h auf  $550 \pm 123$  pg/ml (*Escherichia coli*),  $391 \pm 230$  pg/ml (*Salmonella typhosa*) und  $447 \pm 76$  pg/ml (*Klebsiella pneumoniae*) ab. Dies entspricht Senkungen um ca. 11% (89% *Escherichia coli*), 19% (81% *Salmonella thyphosa*) und 5% (95% *Klebsiella pneumoniae*).

Das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* rief hier zwar einen Konzentrationsanstieg hervor, das Maximum betrug aber lediglich zum Zeitpunkt 24h nur 19% der Konzentration von *Escherichia coli*, 26% der von *Salmonella typhosa* und 23% der von *Klebsiella pneumoniae* (*Pseudomonas aeruginosa* stimulierte Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zum Zeitpunkt 24h:  $103 \pm 156$  pg/ml).

Diese Signifikanz besteht über den gesamten Zeitraum von 8 bis 24h.

Abbildung 7 stellt diese Verläufe dar.

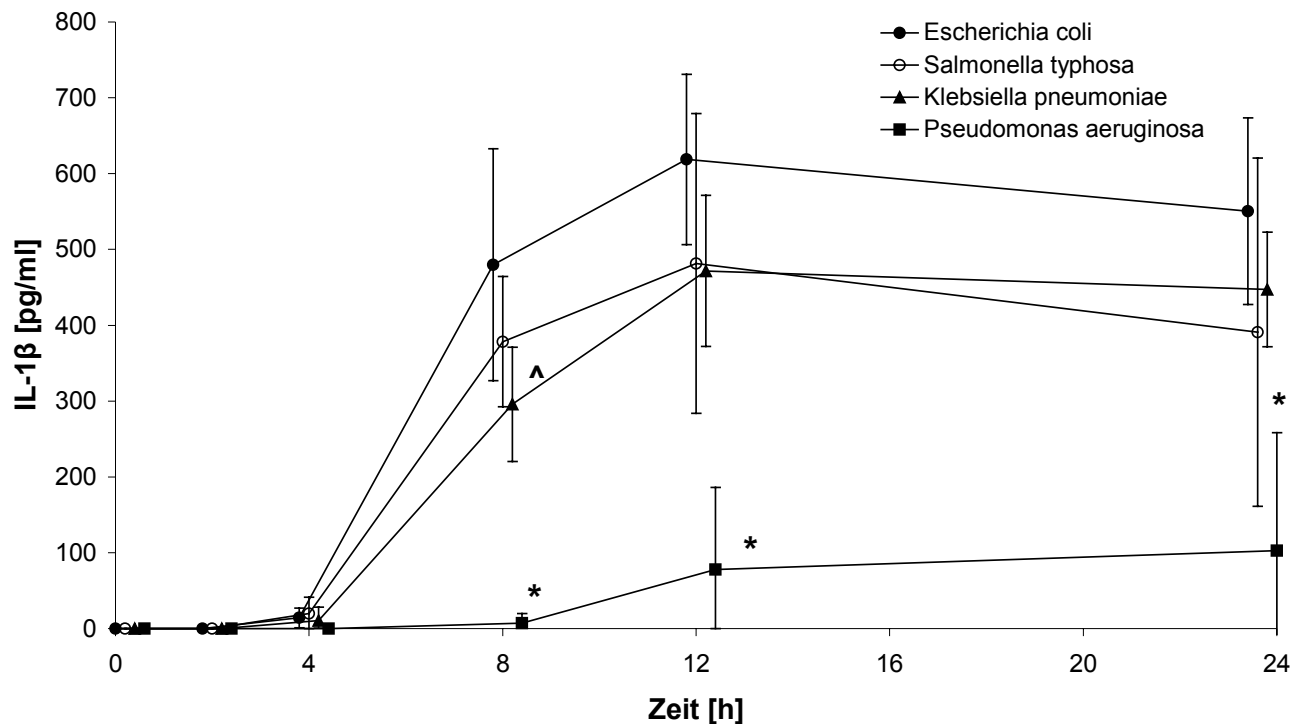


Abbildung 7: Auswirkung der verschiedenen LPS- Derivate auf IL-1 $\beta$  Ausschüttung in Vollblut – Proben über einen Zeitraum von 24h. \* kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. alle anderen, ^ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.1.3. Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) Produktion über 24h

Die Ausschüttung des Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) beginnt nach ca. 4h mit einem langsamen Anstieg der Konzentrationen, hervorgerufen durch die Lipopolysaccharide von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und in einem etwas geringeren Maße auch durch *Klebsiella pneumoniae*. Die Maximalwerte aller Konzentrationen werden erst nach 24h gemessen.

Nach etwa 8h zeigen die Konzentrationskurven von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* Lipopolysaccharid über die nächsten 16h einen annähernd parallelen Verlauf.



Zum Zeitpunkt 24h erreichen die Konzentrationen Werte von  $184 \pm 92$  pg/ml (*Escherichia coli*),  $199 \pm 78$  pg/ml (*Salmonella typhosa*) und  $72 \pm 42$  pg/ml (*Klebsiella pneumoniae*).

Die Konzentration, die durch *Klebsiella pneumoniae* hervorgerufen wird, entspricht ca. 39% der Konzentrationen von *Escherichia coli* bzw. 36% von *Salmonella typhosa*.

Signifikante Unterschiede bestehen zum Zeitpunkt 8h zwischen *Pseudomonas aeruginosa* (0 pg/ml) und *Escherichia coli* ( $18 \pm 7$  pg/ml), zum Zeitpunkt 12h zwischen *Klebsiella pneumoniae* ( $19 \pm 13$  pg/ml) und *Escherichia coli* ( $56 \pm 33$  pg/ml) und zum Zeitpunkt 24h zwischen *Klebsiella pneumoniae* ( $72 \pm 42$  pg/ml) und *Salmonella typhosa* ( $199 \pm 78$  pg/ml).

*Pseudomonas aeruginosa* stellt hier keinen Stimulus für die Produktion von IFN- $\gamma$  dar.

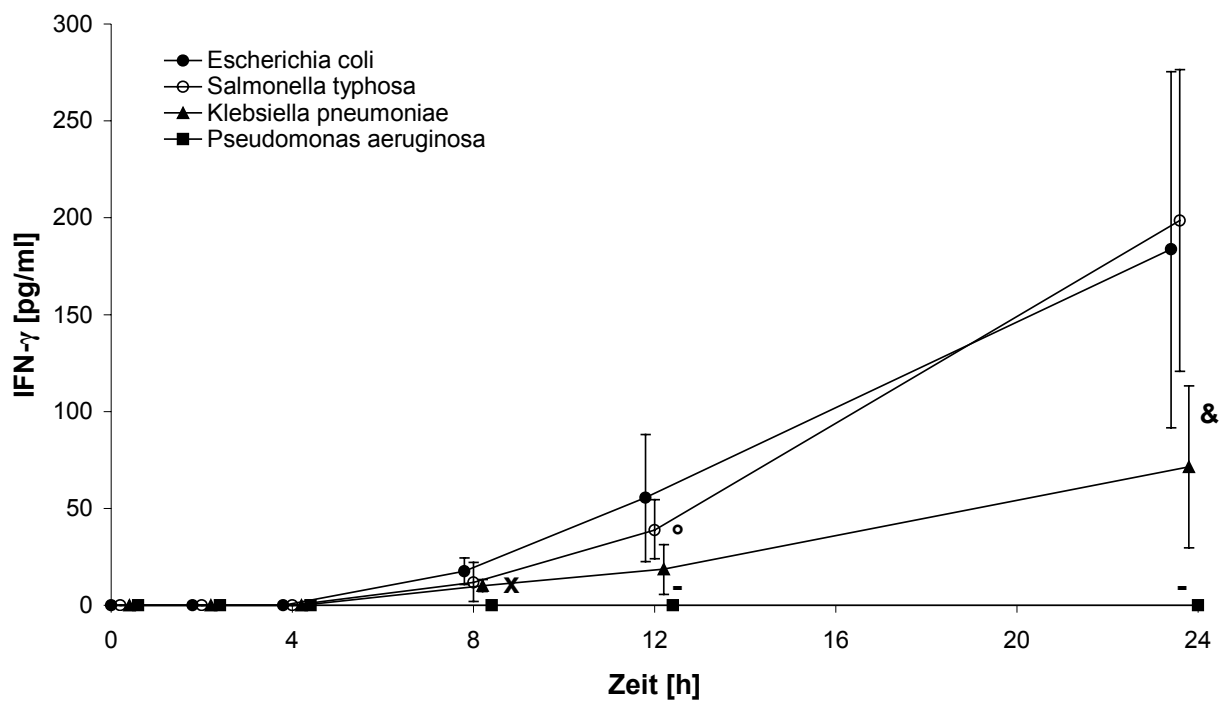


Abbildung 8: Auswirkung der verschiedenen LPS- Derivate auf IFN- $\gamma$  Ausschüttung in Vollblut – Proben über einen Zeitraum von 24h. x kennzeichnet Signifikanz *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Escherichia coli*, ° *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli*, - *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*

### 3.1.4. Produktion von Interleukin-10 (IL-10) über 24h

Der Verlauf der Interleukin-10 (IL-10) Konzentrationen ist vergleichbar mit dem bei der Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Die Werte steigen innerhalb der ersten 12h nur langsam an, bis sie zu diesem Zeitpunkt folgende Konzentrationen erreichen:  $24 \pm 8$  pg/ml (*Escherichia coli*),  $32 \pm 14$  pg/ml (*Salmonella typhosa*) und  $43 \pm 9$  pg/ml (*Klebsiella pneumoniae*).

Zu diesem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Lipopolysacchariden von *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* bzw. *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella pneumoniae* stellt unter allen LPS-Sorten den potentesten Stimulus auf IL-10 dar.

*Pseudomonas aeruginosa* bewirkt auch im Falle des Interleukin-10 (IL-10) über den gesamten Zeitraum von 24h keinen Konzentrationsanstieg.

Innerhalb der nächsten 12h verläuft der Konzentrationsanstieg von Interleukin-10 (IL-10), der durch die Lipopolysaccharide von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* hervorgerufen wird, etwas steiler. Innerhalb der drei LPS-Sorten jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Die Konzentrationsspitze wird nach 24h gemessen. Die Werte betragen hier:  $129 \pm 61$  pg/ml für *Escherichia coli*),  $135 \pm 21$  pg/ml für *Salmonella typhosa*) und für *Klebsiella pneumoniae*  $166 \pm 41$  pg/ml. Der Verlauf ist in Abbildung 9 dargestellt.

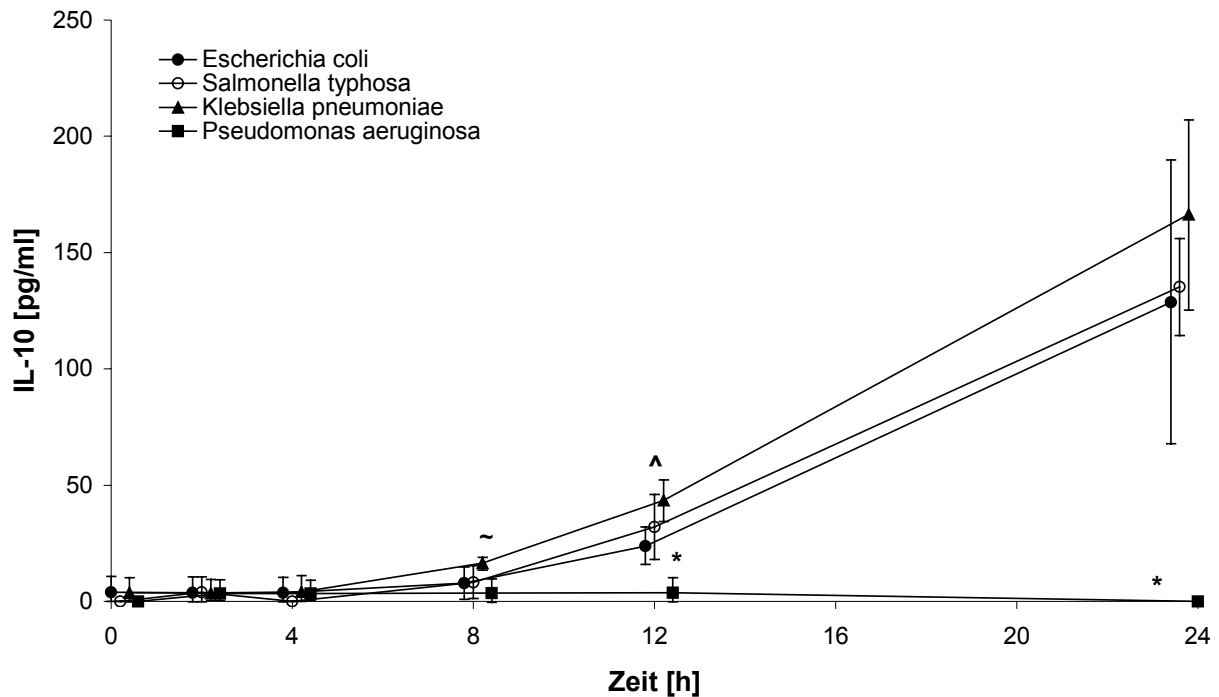


Abbildung 9: Auswirkung der verschiedenen LPS- Derivate auf IL-10 Ausschüttung in Vollblut – Proben über einen Zeitraum von 24h. ~ kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Klebsiella pneumoniae*, \* *Pseudomonas aeruginosa* vs. alle, ^ *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.1.5. MCP-1-Produktion über 24h

Im Falle der MCP-1-Produktion stellt das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* einen potenten Stimulus dar (Abbildung 10).

Die Ausschüttung von MCP-1 beginnt, durch alle LPS-Sorten aktiviert, vornehmlich nach ca. 4h und zeigt dann bis zum Zeitpunkt 24h eine kontinuierliche Steigerung. Bis zum Zeitpunkt 8h verlaufen die Kurven von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* sehr ähnlich. Nach diesem Zeitpunkt ist der Kurvenverlauf von MCP-1 zwischen 8 und 12 Stunden, hinsichtlich der Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* weitgehend gleich. Das Lipopolysaccharid von *Klebsiella pneumoniae* zeigt nach 8h eine etwas stärkere stimulierende Potenz. Zum

Zeitpunkt 12h ist dieser Konzentrationsunterschied zwischen *Klebsiella pneumoniae* und den anderen Sorten signifikant (Zeitpunkt 12h: *Klebsiella pneumoniae*  $1930 \pm 236$  pg/ml; *Escherichia coli*  $1181 \pm 254$  pg/ml; *Salmonella typhosa*  $1128 \pm 377$  pg/ml).

Auch das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* bewirkt bei MCP-1 eine Stimulation. Der Konzentrationsanstieg verläuft langsamer als bei den anderen Sorten. Ab dem Zeitpunkt 12h gleichen sich die Kurven von *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Salmonella thyphosa* an. Zum Zeitpunkt 12h stimulierte das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* die MCP-1 Ausschüttung bis  $1234 \pm 423$  pg/ml. Die Maximalwerte wurden bei allen LP-Sorten nach 24h erreicht. Ein signifikanter Unterschied besteht nur zwischen *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Werte liegen bei  $1863 \pm 473$  pg/ml für *Escherichia coli*,  $2103 \pm 152$  pg/ml für *Salmonella typhosa*,  $2516 \pm 110$  pg/ml für *Klebsiella pneumoniae* und  $1700 \pm 626$  pg/ml für *Pseudomonas aeruginosa*.

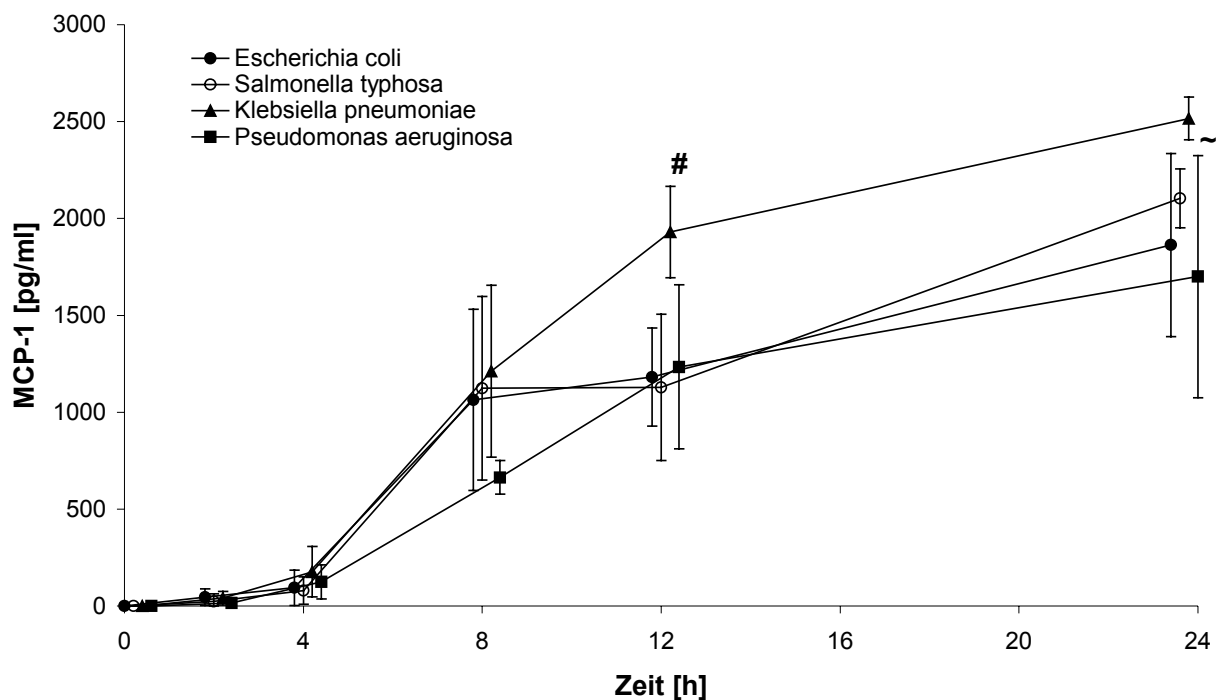


Abbildung 10: Auswirkung der verschiedenen LPS-Derivate auf MCP-1 Ausschüttung in Vollblut – Proben über einen Zeitraum von 24h. # kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Klebsiella pneumoniae* vs. alle, ~ *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Klebsiella pneumoniae*

### 3.2. Dosis-Effekt von Lipopolysaccharid auf die Zytokin-Produktion in Vollblut

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die Ergebnisse der Stimulation mit 0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng/ml Lipopolysaccharid der Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.2.1. TNF- $\alpha$ - Produktion bei zunehmender LPS-Dosis

Über den gemessenen Zeitraum von 24h zeigen sich für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Dosis-Antwort-Kurven für die Lipopolysaccharid- Sorten von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Mit zunehmenden Lipopolysaccharid-Dosierungen steigen auch die Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  Konzentration an. Die Konzentrationsbereiche für diese drei Lipopolysaccharid- Sorten liegen ab der Dosis von 1 ng/ml eng beieinander (Abbildung 11).

Signifikante Unterschiede finden sich zwischen diesen drei Sorten bei der Dosis 0,1 ng/ml.

Bei dieser Dosis wirkt das Lipopolysaccharid von *Klebsiella pneumoniae* weniger stimulierend als die Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*. Die Werte liegen nach Stimulation mit *Escherichia coli*- LPS bei  $968 \pm 705$  pg/ml, mit *Salmonella typhosa* bei  $864 \pm 509$  pg/ml und nach *Klebsiella pneumoniae*-Stimulation bei  $308 \pm 199$  pg/ml.

*Pseudomonas aeruginosa* stimulierte Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bei Dosierungen von 0.1ng/ml, 1ng/ml und 10 ng/ml signifikant weniger als die anderen Sorten.

Erst bei 1000 ng/ml Dosis steigt die Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Konzentration durch *Pseudomonas*-LPS soweit an, dass kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Nach 1000ng/ml *Pseudomonas aeruginosa*- LPS stieg die TNF- $\alpha$ -Konzentration auf  $1013 \pm 380$  pg/ml, nach 1000ng/ml *Escherichia coli*- LPS auf  $2415 \pm 1858$  pg/ml, nach 1000ng/ml *Salmonella typhosa*- LPS auf  $1955 \pm 1186$  pg/ml und nach 1000ng/ml *Klebsiella pneumoniae*- LPS auf  $1660 \pm 1064$  pg/ml.

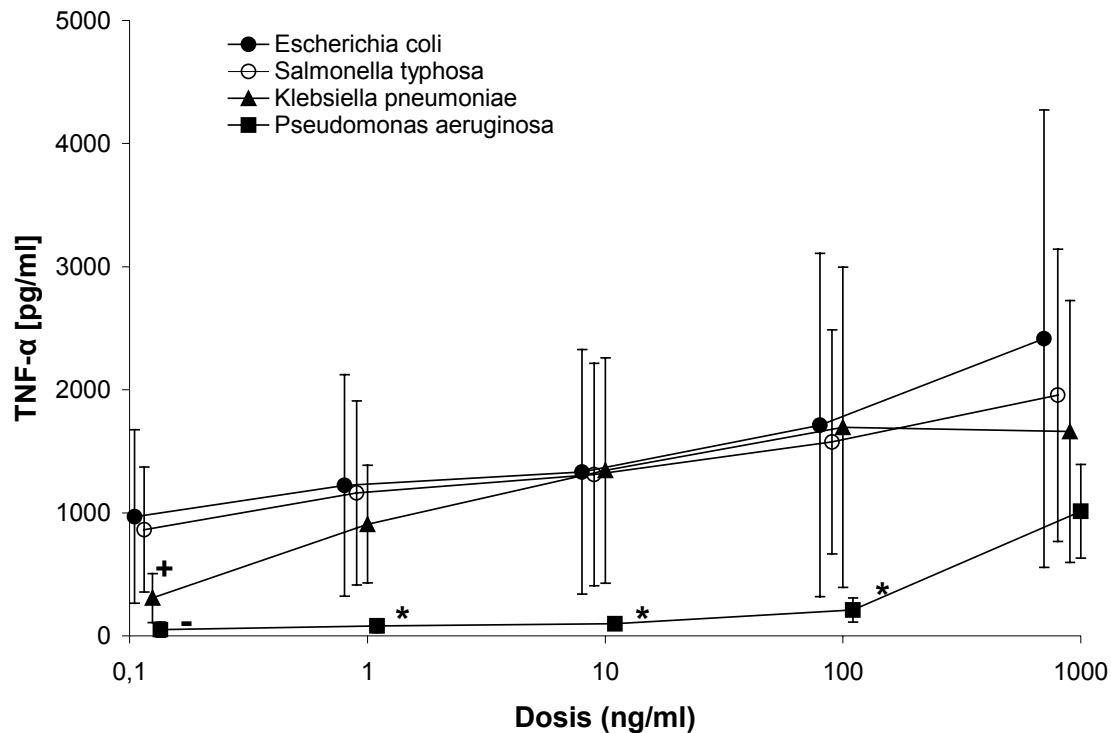


Abbildung 11: Auswirkung zunehmender LPS- Dosen auf die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . \* kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. alle, + kennzeichnet *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*, - *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*

### 3.2.2. Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )-Produktion bei zunehmender LPS-Dosis

Hinsichtlich der Produktion von IL-1 $\beta$  lässt sich keine Dosis-Antwort-Kurve für die LPS-Sorten von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* erzielen. Die Spitzenkonzentrationen werden bereits bei 1 ng/ml erreicht (Abbildung 12).

Die Kurven der drei Sorten verlaufen sehr ähnlich, wobei signifikante Unterschiede lediglich in dem schlechteren stimulierenden Effekt von *Klebsiella pneumoniae* bei der Dosierung von 0,1ng/ml bestehen. Die folgenden Werte verdeutlichen dies: *Klebsiella pneumoniae* - Lipopolysaccharid erzielte bei 0,1ng/ml Interleukin-1 $\beta$ -Werte von  $881 \pm 404$  pg/ml. *Escherichia coli* konnte  $1581 \pm 315$  pg/ml Interleukin-1 $\beta$  hervorrufen und *Salmonella typhosa*  $1503 \pm 265$  pg/ml.

Diese Signifikanz besteht bei der Dosierung von 0,1 ng/ml im Bezug Klebsiella pneumoniae zu Escherichia coli und Salmonella typhosa. Der Verlauf verändert sich dahingehend, dass bei der Dosierung von 1 ng/ml ein signifikanter Unterschied nur noch zu Escherichia coli besteht (Klebsiella pneumoniae:  $1413 \pm 291$  pg/ml; Escherichia coli:  $1801 \pm 293$  pg/ml). Im Gegensatz dazu lässt sich für Pseudomonas aeruginosa ein Dosis-Antwort-Effekt erzielen. Mit steigender Dosis nimmt die IL-1 $\beta$  Ausschüttung kontinuierlich bis zur Dosis 1000 ng/ml LPS zu. Die Konzentrationen sind jedoch bis 100 ng/ml signifikant geringer als nach Stimulation durch die anderen Sorten. Erst bei der Dosis 1000 ng/ml gleichen sich die Werte an und eine geringe Signifikanz besteht nur noch zu Escherichia coli und Salmonella typhosa.

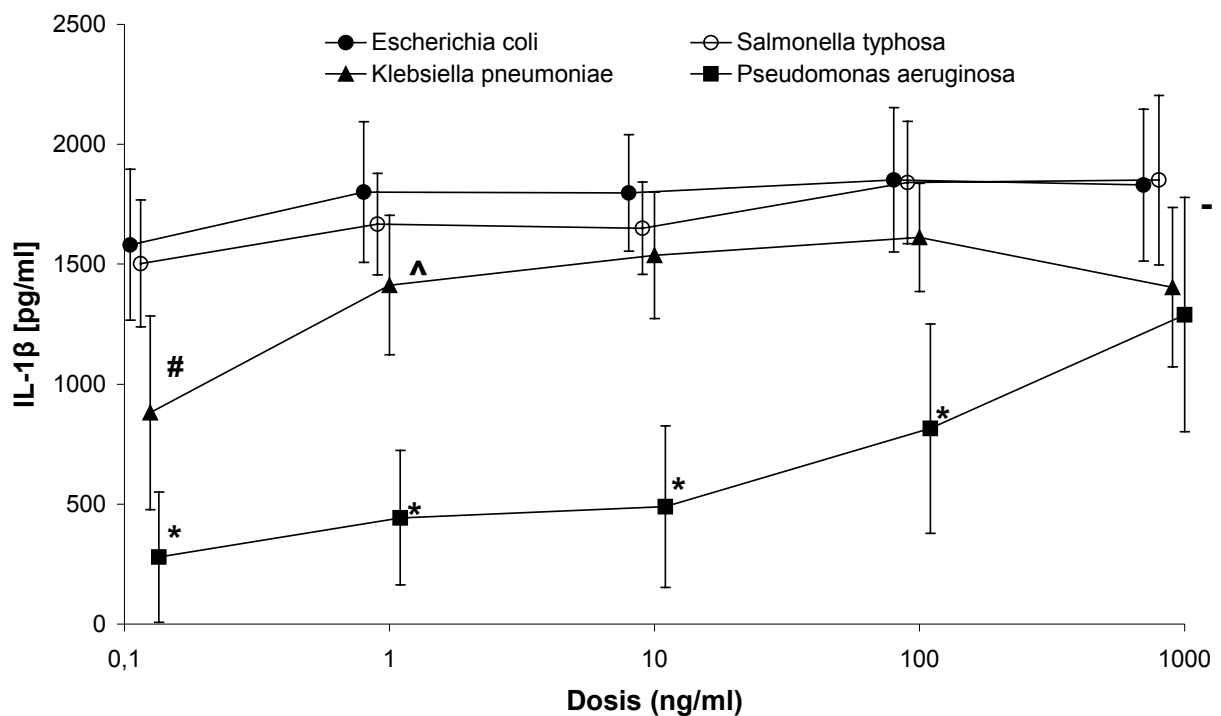


Abbildung 12: Auswirkung zunehmender LPS- Dosen auf die Ausschüttung von IL-1 $\beta$ .

\* kennzeichnet die Signifikanzen zwischen Pseudomonas aeruginosa vs. alle,  
 # Klebsiella pneumoniae vs. alle, ^ Klebsiella pneumoniae vs. Escherichia coli und  
 Pseudomonas aeruginosa, - Pseudomonas aeruginosa vs. Escherichia coli und  
 Salmonella typhosa

### 3.2.3. Die Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) Produktion bei zunehmender LPS-Dosis

In Bezug auf die IFN- $\gamma$ -Produktion lassen sich Dosis-Antwort-Kurven für *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* erzielen. Die Spitzenwerte für diese beiden Lipopolysaccharid-Sorten liegen bei 1000ng/ml für *Escherichia coli* mit 468,2pg/ml und für *Salmonella typhosa* mit 569,6pg/ml (Abbildung 13). Dies gilt für *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* nicht. Die Werte liegen im dem gesamten Dosisbereich signifikant unter denen von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*. Zwischen *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* besteht während des gesamten Verlaufes kein signifikanter Unterschied. Die Interleukin-1 $\beta$  Höchstkonzentrationen für *Klebsiella pneumoniae* - LPS werden bereits bei 100ng/ml erzeugt und sinken bis 1000ng/ml wieder leicht ab. (Konzentration bei 100ng/ml: 73,0pg/ml; Konzentration bei 1000ng/ml: 44,1ng/ml). Der Maximalwert für *Pseudomonas aeruginosa* liegt bei 1000ng/ml und ist mit 29,2pg/ml sehr niedrig.

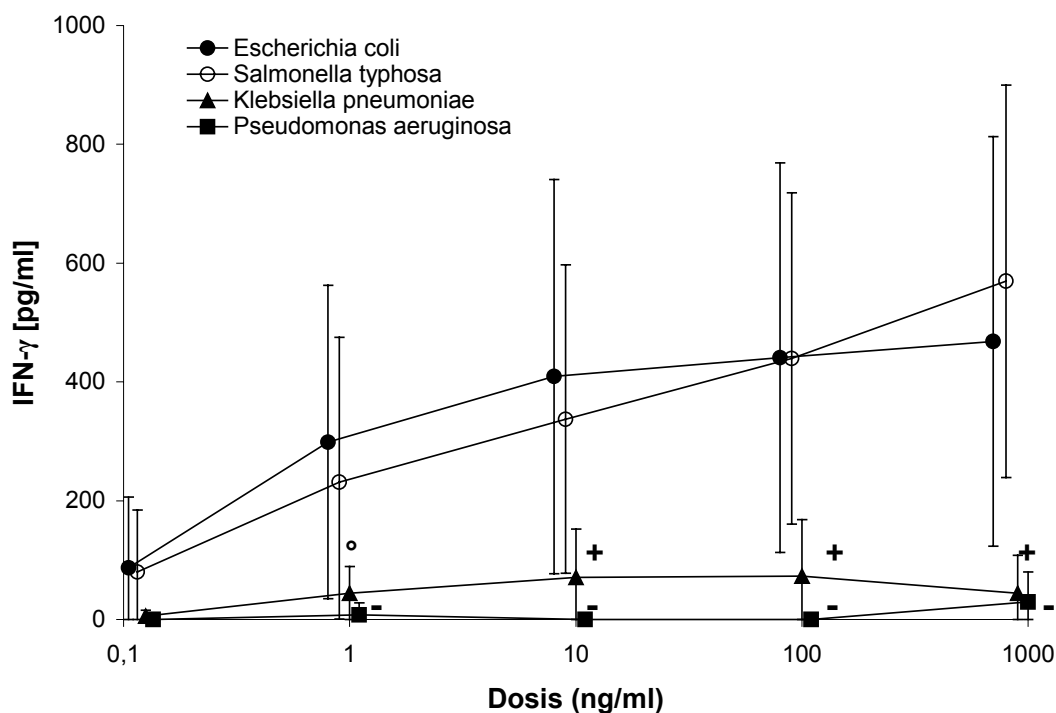


Abbildung 13: Auswirkung zunehmender LPS- Dosen auf die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ .- kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*,+ *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*, ° *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli*



### 3.2.4. Interleukin-10 (IL-10) Produktion bei zunehmender LPS-Dosis

Das Kurven-Verlauf von Interleukin-10 (IL-10) ähnelt dem von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Die Konzentrationen an Interleukin, die erreicht werden, liegen jedoch nicht im Bereich von ca. 1000 und mehr pg/ml, sondern eher im Bereich von 100 und mehr pg/ml (Abbildung 14).

Signifikante Unterschiede in der Interleukin-Stimulation bestehen zwischen *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* bei einer Dosis von 0,1 ng/ml. Hier besitzt *Klebsiella pneumoniae* eindeutig weniger Potenz. Die Werte liegen für die Lipopolysaccharide von *Klebsiella pneumoniae* bei  $39 \pm 25$  pg/ml, für *Escherichia coli* bei  $141 \pm 66$  pg/ml und für *Salmonella typhosa* bei  $134 \pm 60$  pg/ml. Bei einer Dosis von 1 ng/ml ist die Signifikanz bereits aufgehoben.

Bei allen drei LPS-Sorten kommt es bei zunehmender Dosis zu einer vermehrten Interleukin-10-Ausschüttung. *Pseudomonas aeruginosa* zeigt auch einen Dosis-Antwort-Verlauf, wobei der stimulierende Effekt insgesamt nur gering ist und im Dosisbereich von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml signifikant geringer ist als bei den anderen drei LPS-Sorten. Im Dosisbereich von 0,1 ng/ml bis 1 ng/ml besteht diese Signifikanz bereits zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und den Lipopolysacchariden von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*. Zu *Klebsiella pneumoniae*-LPS entwickelt sie sich erst ab einer Dosis von 1 ng/ml.

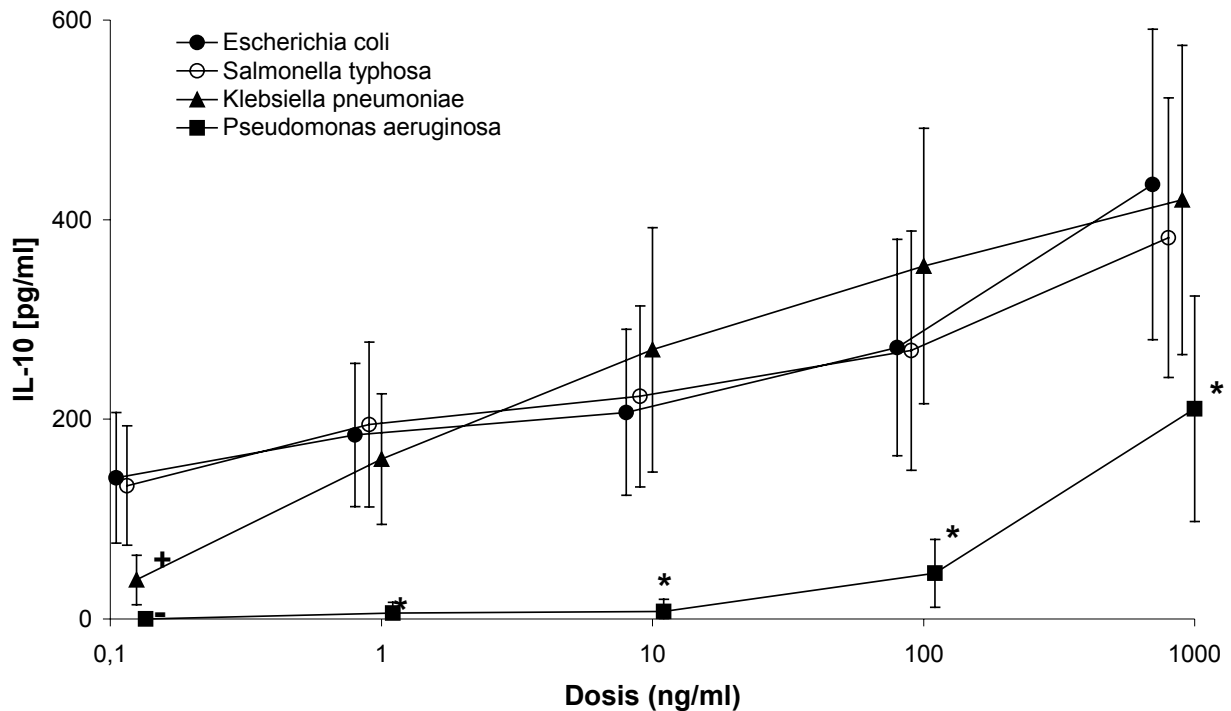


Abbildung 14: Auswirkung zunehmender LPS- Dosen auf die Ausschüttung von IL-10. - kennzeichnet die Signifikanz zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*, + *Klebsiella pneumoniae* vs. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*, \* *Pseudomonas aeruginosa* vs. alle

### 3.2.5. MCP-1-Produktion bei zunehmender LPS-Dosis

Die Produktion von MCP-1 wird durch zunehmende Dosen der Lipopolysaccharide von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* nicht angeregt. Die Antwortspitzen lagen bereits bei 0,1 ng/ml (Abbildung 15).

Das *Pseudomonas aeruginosa*- Lipopolysaccharid stimuliert bereits ab einer Dosis von 0,1 ng/ml zunehmend die MCP-1-Ausschüttung. Ab 10 ng/ml nimmt dieser Effekt noch zu, so dass bei 1000 ng/ml die Stimulation signifikant größer ist als für *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Folgende Werte verdeutlichen dies: *Pseudomonas aeruginosa* bewirkt eine MCP-1-Konzentration von  $4446 \pm 1954$  pg/ml, *Escherichia coli*  $881 \pm 459$  pg/ml, *Salmonella typhosa*  $1589 \pm 1005$  pg/ml und *Klebsiella pneumoniae* eine Konzentration von  $895 \pm 750$  pg/ml. Ab Dosierungen von 10 ng/ml

wird die MCP-1-Aussüttung durch *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* stimuliert geringer.

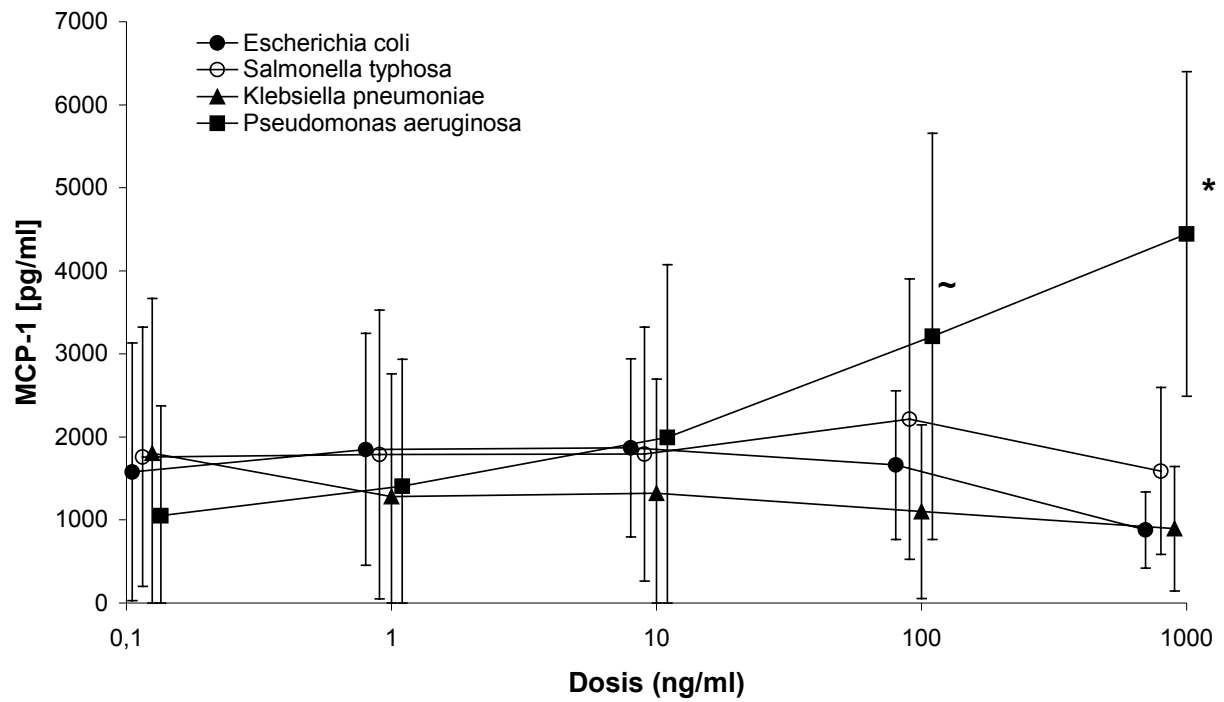


Abbildung 15: Auswirkung zunehmender LPS- Dosen auf die Ausschüttung von MCP-1. ~ kennzeichnet die Signifikanzen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* vs. *Klebsiella pneumoniae*, \* *Pseudomonas aeruginosa* vs. alle

## 4 Diskussion

---

Die Mechanismen, die einer Erkrankung wie der Sepsis zugrunde liegen reichen weit zurück auf die Ebene des Immunsystems mit all seinen komplexen molekularen Interaktionen.

Da das Lipopolysaccharid (LPS) von gram-negativen Bakterien den stärksten bekannten Stimulus für das Immunsystem darstellt und die häufig tödlich verlaufende Sepsiskaskade induzieren kann, bietet es sich an, mit seiner Hilfe die einzelnen Wege des Immunsystems zu untersuchen.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem Teil des Immunsystems, an dem die „Weichen“ für die Reaktion des Organismus auf ein starkes Pathogen gestellt werden.

Das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien ist seit geraumer Zeit Gegenstand ausgedehnter Studien. Es fällt jedoch auf, dass die bakterielle Herkunft des Moleküls oftmals vernachlässigt wird. Wie groß dieser Einfluss auf die LPS- Wirkung ist und wodurch dieser begingt sein könnte, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Effekte der Stimulation mit Lipopolysaccharid - Derivaten der Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* auf die Produktion der repräsentativen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), MCP-1 und Interleukin-10 (IL-10) können mittels ELISA untersucht werden. Hierzu wurden einfache menschliche Vollblutproben verwendet, um ein möglichst natürliches Zell- und Immunmilieu zu gewährleisten, in dem die Zellen untereinander kommunizieren dürfen („cross-talk“).

Bei Erforschung der biologischen Aktivität von Lipopolysacchariden (LPS), kristallisierte sich schnell heraus, dass die immuninduzierende Komponente des Moleküls die Phospholipid -Region, das Lipid A ist. Diese Region ist bei allen Bakterienstämmen gleich. Die artspezifischen Unterschiede des LPS - Aufbaus liegen in der O-spezifischen Polysaccharid- Kette.

Von dieser Erkenntnis ausgehend, müsste es zu einer art- unabhängigen und gleichbleibenden Ausschüttung der ausgewählten Mediatoren kommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen jedoch eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterienstämmen:

Die Lipopolysaccharide (LPS) von *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* stellen starke Stimuli für die Produktion der proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), MCP-1 und das antiinflammatorische Interleukin-10 (IL-10) dar. *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* zeigen hierbei sehr ähnliche Kurvenverläufe.

*Klebsiella pneumoniae* zeigt einen schwachen Effekt auf die Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Produktion. Hinsichtlich der TNF- $\alpha$  Produktion ist es im Vergleich zu *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* ebenfalls weniger potent.

*Pseudomonas aeruginosa* hat einen nur sehr geringen stimulierenden Effekt auf die Produktion von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). 10 ng/ml Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* ruft über 24h bei Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-10 (IL-10) überhaupt keine Reaktion hervor.

Bei MCP-1 jedoch kann *Pseudomonas aeruginosa* eine potente, den anderen Sorten vergleichbare, Ausschüttung hervorrufen. Hier könnte das Vorhandensein von anderen, bereits ausgeschütteten Zytokinen einen zusätzlichen Stimulus darstellen. Zudem ist dies ein Hinweis auf verschiedene Produktionsmechanismen für Zytokine.

Es ist aus vielen Studien bekannt, dass Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der oft als erster Mediator nach einer zellulären Provokation in Erscheinung tritt, selbst einen Stimulus für die Produktion weiterer Chemokine in vivo und in vitro darstellt (Rabinovici et al., 1969). Betrachtet man die Kurvenverläufe von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-10 (IL-10) über 24h fällt auf, dass die Konzentrationen beider Zytokine erst nach ca. 12h deutlich ansteigen.

Da der Lipopolysaccharid- Toll-like- Rezeptorkomplex aber schnell und früh agiert, könnte diese Spätwirkung auch auf einer solchen Zytokin - Zytokin Interaktion beruhen.

In der vorliegenden Studie versagt das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* beim Hervorrufen der TNF- $\alpha$ - Antwort zu den Zeitpunkten, an denen MCP-1 bereits deutlich erhöht ist.

Die MCP-1 Ausschüttung wird also in diesem Falle direkt durch das *Pseudomonas aeruginosa*- Lipopolysaccharid hervorgerufen und nicht indirekt durch bereits

vorhandenen Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Es muss einen strukturellen oder funktionellen Unterschied zu den anderen LPS-Sorten geben.

Hajjar et al. beschrieben 2002 die Fähigkeit von Toll-like Rezeptor 4 mittels seiner extrazellulär gelegenen hypervariablen 82- Aminosäuren- Region, verschiedene Formen von *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysacchariden zu erkennen.

Im Rahmen von Erkrankungen, wie zum Beispiel der zystischen Fibrose verändert *Pseudomonas aeruginosa* seinen Acylierungszustand. Dies wird vom Toll-like Rezeptor 4 erkannt.

Die vorliegenden Daten rechtfertigen die Bestätigung einer biologisch aktiven Komponente von *Pseudomonas aeruginosa*, die derartige Wirkungen erzielen kann.

Eine solche Komponenten kann in Form von Purinen, Exoenzym S, interaktiven Proteine oder Acylierungszuständen vorliegen. Dies wurde bereits von verschiedenen Autoren in der Vergangenheit postuliert (Cusumano et al., 1996; Schromm et al., 2000; Epelmann et al., 2000).

In Untersuchungen zur Struktur des biologisch aktiven Endotoxinabschnittes, Lipid A, konnten feine Unterschiede gefunden werden, die ebenfalls die Ergebnisse erklären würden.

Lipid A besteht aus  $\beta$  1,6- verbundenen D-Glucosamin- Disacchariden (GlcN), die sechs gesättigte Fettsäuren und zwei negativ geladene Phosphate an definierten Stellen tragen.

Feine Änderungen dieser strukturellen Anordnung, zum Beispiel in Hinblick auf Ladung, Verteilung oder Sättigungsgrad, können neue Aktivitätsmuster ergeben (Rietschel et al., 1996).

Netea et al. beschrieben 2001, dass der Lipid A Anteil von *Salmonella typhimurium* Fettsäuren beinhaltet, deren Phosphatgruppen sich von denen des *Escherichia coli*- Lipid A unterscheiden.

Konsekutiv können also auch solche oder ähnliche Strukturbesonderheiten von *Pseudomonas aeruginosa* postuliert werden.

Bemerkenswerterweise lassen sich in Sputumproben von Patienten mit zystischer Fibrose erhöhte Werte von MCP-1 und anderen Chemokinen nachweisen.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer chronischen Infektion des Alveolargewebes mit *Pseudomonas aeruginosa*. Die Bakterien sind durch den umgebenden dickflüssigen Schleim vor intensiver Antibiotikatherapie geschützt.

Die selektiven und starken Einflüsse des Lipopolysaccharids von *Pseudomonas aeruginosa* auf die MCP-1-Produktion könnten die persistierende Entzündungsreaktion in der Lunge erklären. Da MCP-1 einen effektiven chemotaktischen Reiz auf Monozyten ausübt, enden diese Entzündungsreaktionen in der übermäßigen Einwanderung zellulären Infiltrates mit Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen. Eine therapierefraktärer *circulus vitiosus* beginnt, da in der Spätphase andere, für die Abwehr wichtigen Mediatoren unterdrückt werden.

Die Messungen der Zytokinausschüttung innerhalb von 24h bei zunehmenden LPS-Dosen zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen den Bakterienstämmen auf. Über einen Zeitraum von 24 h bewirkten die Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* Dosis-Antwort-Kurven bei den Mediatoren Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-10 (IL-10). Die Ausnahmen stellen Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und MCP-1 dar. Hier wurden die Antwortspitzen bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml erreicht. Geringe Dosen reichen aus, um die volle Zytokin-Ausschüttung zu erreichen.

Der Effekt von *Klebsiella pneumoniae* - LPS ist vergleichbar mit dem von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa*. Die Ausnahme bildet hier die signifikant geringere Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Stimulation. Die Tatsache, dass sich für *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* keine Dosis-Antwort-Verläufe erzielen lassen, verdeutlicht die richtige Dosisauswahl und korrekte Messung dieses Versuches. Es ist möglich, dass noch höhere Dosierungen für *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* notwendig sind, um Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zu stimulieren.

*Pseudomonas aeruginosa* besitzt nur einen geringen stimulierenden Effekt auf Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-10 (IL-10) bei einer Konzentration von 1000 ng/ml. Auf die Produktion von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) kann es einen Dosis-Antwort-Effekt hervorrufen, der jedoch kleiner ist als bei den anderen Stämmen.

Das Lipopolysaccharid von *Pseudomonas* hat im Vergleich zu den anderen Präparaten einen ausgesprochen stimulierenden Einfluss auf die MCP-1- Ausschüttung im Bereich

zwischen 0,1 bis 10 ng/ml. Dieser nimmt im Gegensatz zu den anderen LPS-Sorten bei einer Dosis von 1000 ng/ml sogar noch zu.

Vergleicht man die Messdaten von MCP-1- und dem antiinflammatorisch wirkenden Interleukin-10 (IL-10), nach der Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*- LPS, wird deutlich, dass *Pseudomonas aeruginosa* Interleukin-10 (IL-10) signifikant schlechter stimuliert als die Lipopolysaccharide der anderen Bakterienstämme (Diagramm 2e vs. Diagramm 2d). Ob der augenscheinlich selektive Effekt des *Pseudomonas aeruginosa*-LPS auch bei Zytokinen wie MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und IL-8, die bei derartigen pulmonalen Erkrankungen ebenfalls verstärkt nachweisbar sind, auftritt, müssen weitere Studien zeigen.

Hinsichtlich der Stimulationsfähigkeit der Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* konnten in dieser Studie sehr ähnliche Immunreaktionen nachgewiesen werden. In keinem der Versuche kam es zu signifikanten Konzentrationsunterschieden. Sowohl im gesamten Zeitverlauf als auch bei steigender Dosierung zeigen die Konzentrationskurven aller gemessener Zytokine nach Stimulation mit *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* beinahe parallele Verläufe (Abbildung 6 bis 10 und 11 bis 15). Bei diesen beiden Lipopolysacchariden sind folglich die größten strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen anzunehmen.

Die hingegen geringere Immunantwort auf *Klebsiella pneumoniae*- LPS hinsichtlich der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )- und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) - Ausschüttung lässt die Vermutung zu, dass hierbei intrazellulär andere Signalwege als bei *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* bevorzugt werden. Diese Ergebnisse könnten aber auch durch Zellinteraktionen oder hier nicht gemessenen, aber dennoch vorhandene Mediatoren, hervorgerufen werden. Auch mit steigender Lipopolysaccharid- Dosis ist dieser Effekt nicht auszugleichen.

Wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben, gibt es einen alternativen Signalweg unter Umgehung des MyD88 Adaptermoleküls (Kobayashi et al., 2002).

In tierexperimentellen Studien mit MyD88 defizienten Mäusen wurden die Signalweiterleitungsmechanismen der einzelnen Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie untersucht.



Toll-like Rezeptor 2 (TLR 2), Toll-like Rezeptor 7 (TLR 7) und Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9) konnten bei MyD88 defizienten Zellen keine Weiterleitung des Signals nach Stimulation mit ihren speziellen Liganden gewährleisten. Es konnte keinerlei Aktivierung von Signalmolekülen wie NF- $\kappa$ B oder MAP-Kinasen gemessen werden. Es wurde postuliert, dass diese Rezeptoren vollständig in ihrer Signaltransduktion von MyD88 abhängig sind.

Im Gegensatz dazu konnte bei Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) nach Stimulation mit seinem Liganden LPS, eine Reaktion bzw. die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, auch bei defizienten Tieren gemessen werden. Die Expressionskinetik stellte sich jedoch verzögert dar. Dies belegte die Existenz eines von MyD88 unabhängigen Weges in der Signalkette von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und seinem Liganden LPS (Takeda und Akira, 2004).

Durch weitere Analysen konnten mehrere Gene identifiziert werden, die unabhängig induziert werden. Hierzu gehören zum Beispiel die durch Interferon (IFN) induzierbaren Gene IP-10 und GARG-16.

Lipopolysaccharid ist in der Lage, direkt den Transkriptionsfaktor IRF-3 zu aktivieren. Dieser induziert dann IFN- $\beta$ . IFN- $\beta$  aktiviert seinerseits STAT1 und daraus folgt die Induktion dieser Gene. Für TLR3 konnte dies ebenfalls aufgezeigt werden (Takeda und Akira, 2004). TLR3 und TLR4 besitzen also beide von MyD88 unabhängige Signalwege.

In der Folge konnten neben MyD88 mehrere wichtige Adaptermoleküle identifiziert werden, die TIR-Domänen enthalten. Hierzu gehören sowohl „TIRAP“ (Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne enthaltendes Adapterprotein), als auch „MAL“ (MyD88-adapter-like), „TRIF“ (TIR- domaine – containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) und „TRAM“ (TRIF related adaptor molecule ). TRIF und TRAM sind wesentliche Signalmoleküle der MyD88 unabhängigen Signalwege für TLR4. Nach Stimulation des TLR4 durch LPS, rekrutiert TRIF die IRF-Kinase TBK1. Der Transkriptionsfaktor IRF-3 wird daraufhin phosphoryliert und es kommt zur Bildung eines IRF-3-Dimers, welches in den Zellkern transloziert und dort die Bildung von Typ-1-Interferon induziert (Kawai et al., 2001).

Möglicherweise ist das Adaptermolekül TIRAP zudem in der Lage, den NF- $\kappa$ B Signalweg direkt zu induzieren.

Es gibt also viele verschiedene Wege eine Geninduktion und somit eine Mediatorausschüttung hervorzurufen.

Die Suche und Identifizierung weiterer Adaptermoleküle ist zudem Gegenstand der derzeitigen und zukünftigen Forschung. Es werden noch weitere Moleküle gefunden werden, die die bekannten Differenzierungswege zusätzlich ergänzen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage nach dem Auslöser des einen oder des anderen Weges. Es erscheint möglich, dass es Kofaktoren oder Adaptermoleküle gibt, die einen Teil des LPS-Moleküls erkennen, der außerhalb der Lipid A- Region liegt und artspezifisch ist. Zu vergleichen mit einem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, bei dem ein zusätzlicher Schlüssel einen anderen Weg eröffnet. Das LPS- Molekül besitzt an seinem Ende Oligosaccharid- Einheiten, die artspezifisch sind und für eine solche zusätzliche Bindung Angriffspunkte darstellen könnten.

Die an der LPS- Erkennung beteiligten Komoleküle wie zum Beispiel MD-2, das als Kofaktor des Toll-like Rezeptors 4 dient, könnte für eine Feinspezifität sorgen.

Es ist bekannt, dass TLR4 ohne diesen Kofaktor nicht in der Lage ist, LPS zu binden.

Nagai et al. konnten 2002 belegen, dass MD-2 defiziente Mäuse nach einer Infektion mit Lipopolysaccharid den Endotoxin Schock überlebten. Nach der Infektion mit *Salmonella typhimurium* hingegen erkrankten die Tiere. Re F. und Stromminger beschrieben 2003 zwei separate Einheiten des Moleküls MD-2. Eine Einheit besteht aus hydrophilen und geladenen Anteilen, die für die Bindung an LPS verantwortlich ist. Die zweite Region ist basenreich und spielt beim weiteren Übertragungsweg eine Rolle.

Eine unterschiedliche Erkennung durch den einen oder anderen Anteil könnte somit ebenfalls zu einer Modellierung der weiteren Signalwegmoleküle führen. Diese wichtige Funktion des MD-2 Moleküls konnte vor kurzem im Jahre 2005 von einer pharmakologischen Forschungsgruppe um Brandl et al. bei der Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten zur Mediatormodulation belegt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-6 durch eine Bindung von MD-2 mit dem rekombinanten Fusionsprotein T4Fc (Flagmrs TLR4-hulgGFc) nach Lipopolysaccharid-Stimulation vermindert werden kann.

T4Fc besteht aus extrazellulären Anteilen des TLR4 und humanem IgG-Fc Fragment.

IgG-Fc ist ein kristallisierbares Fragment, die so genannte „schwere Kette“ des Immunglobulins, welches Effektorfunktion hat. So entsteht ein löslicher Rezeptor, der offensichtlich nach Bindung an MD-2 die Immunreaktion des Organismus beeinflusst.

Demnach könnten die physiologisch im Blut vorhandenen Immunglobuline eine ähnliche Affinität zu MD-2 besitzen und einen dementsprechenden immunmodulatorischen Einfluss ausüben. Hier könnten die genetischen Prädispositionen, wie zum Beispiel Lebensalter, Geschlecht und genetische Polymorphismen eine Rolle spielen. In der vorliegenden Studie wurde nur das Blut von männlichen Probanden in ähnlichem Alter untersucht. In wieweit also das Geschlecht oder das Lebensalter die Ergebnisse messbar beeinflusst, wäre fortführend zu klären.

Ergänzend dazu fehlen in den Voll-Blut-Proben jegliche Organzellen, wie zum Beispiel Epithelzellen oder Dendritische Zellen. Ein „cross-talk“ zwischen den Blutzellen kann zwar stattfinden, um aber die Ergebnisse auf einen gesamten Organismus anzuwenden, fehlen die noch möglichen Interaktionen der anderen Körperzellen, die zu noch größerer Komplexität beitragen würden. Ergänzende Studien könnten mit anderen Zelllinien, zum Beispiel Makrophagen oder mit Tiermodellen durchgeführt werden.

Betrachtet man wiederum auf molekularer Ebene des Organismus die bekannten Signalwege, sowohl die MyD88- abhängigen als auch die alternativen Signalwege aus statistischer Sicht, findet man in der Literatur keine Angaben über den Zeitpunkt, die Voraussetzungen und die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung des einen oder des anderen Weges. Es wäre interessant diese Fragen beantworten zu können, da es wahrscheinlich eine große Rolle spielt, welcher Weg, zu welcher Zeit und wie häufig genommen wird. Die Signalwege münden immer in einer speziellen Genexpression, die wiederum zu einer charakteristischen Zytokin-Produktion führt. Da aber anzunehmen ist, dass NF- $\kappa$ B andere Gene induziert als zum Beispiel der Transkriptionsfaktor IRF-3, ist die konsekutive Veränderung des Zytokinmilieus folglich auch abhängig von den oben genannten Faktoren.

Auch außerhalb der Zelle gibt es viele Variablen, von denen der Signalweg und damit die entstehende Immunantwort abhängt. Alle beteiligten Moleküle können den Verlauf modellieren. Hier sind zum einen die Scavenger-Rezeptoren zu nennen. Sie erkennen die artspezifischen Anteile des LPS-Moleküls und modifizieren so die nachfolgende Immunreaktion. Diese Rezeptoren werden sowohl von Makrophagen, als auch von Lipopolysaccharid selbst stimuliert. Die bakterielle Herkunft des Lipopolysaccharides könnte ebenfalls für eine unterschiedliche Anzahl an Scavenger-Rezeptoren

verantwortlich sein. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der Rezeptoren und somit die Menge der abgefangenen, bzw. die Menge der „durchgelassenen“ LPS-Moleküle, die Zusammensetzung der Mediatoren beeinflusst. Hier spielen wiederum auch Interaktionen einzelner Zytokine untereinander eine Rolle.

Die gewonnenen Daten aus den Interleukin-10 (IL-10) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Messungen über 24h (Abbildung 8 und 9), lassen einen solchen Mechanismus vermuten. Die späte Reaktion der Interleukin-10 (IL-10) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Ausschüttung auf die Lipopolysaccharide der Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* und *Klebsiella pneumoniae* ist wahrscheinlich keine direkte Wirkung der LPS- Toll-like Rezeptor- Interaktion. Diese würde schnell und früh Wirkung zeigen. Vielmehr könnten bereits im Milieu vorhandene Zytokine untereinander agieren und ihrerseits weitere Blutzellen zur Ausschüttung von Interleukin-10 (IL-10) anregen.

Des weiteren gibt es bereits Hinweise darauf, dass die SR-As zusätzlich in der Lage sind, unter Umgehung des CD14/TLR-MD2-Signalweges, die Produktion von Interleukin-1 zu induzieren (Miller und Krangel, 1992). Die Auslöser und Bedingungen für diese Induktion sind jedoch noch nicht gefunden worden. Für SR-As erkennbare strukturelle Molekülunterschiede könnten eine Rolle spielen.

Wie die Studiendaten dieser Arbeit zeigen, führt die Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*- Lipopolysaccharid zu einer sehr viel geringeren Interleukin-1 $\beta$  Ausschüttung als dies die anderen Sorten vermögen. Wenn der alternative, zusätzliche Interleukin-1 Produktionsweg durch die SR-As nach der Erkennung des *Pseudomonas aeruginosa*-LPS bei dieser Bakteriensorte eine untergeordnete Rolle spielt, würde dies die signifikant geringere Ausschüttung, im Vergleich zu den anderen LPS-Sorten erklären.

Ergänzend zu diesen Mechanismen sind auch die löslichen Rezeptoren und bakteriziden Proteine zu nennen. Ein solches Protein ist zum Beispiel das „BPI“ (bakterizides permeabilitätssteigerndes Protein), welches in den Azurgranula von neutrophilen Leukozyten (PMN) vorkommt. BPI erniedrigt die Aktivität des Endotoxins, indem es seine Bindungsfähigkeit mit CD14 vermindert (Lamy und Deby-Dupont, 1995).

Als lösliche Rezeptoren sind vor allem Interleukin-neutralisierende Rezeptoren wie p55 und p75 (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -spezifisch) und Interleukin-1R I/II (Interleukin-1 $\beta$

spezifisch) zu nennen. Diese löslichen Formen von Rezeptoren entstehen wahrscheinlich durch proteolytische Mechanismen oder alternatives Spleißen (Mohler et al., 1993). Ivami et al. konnten 2000 sogar lösliche, alternative Spleißformen des Toll-like Rezeptors 4 in murinen Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 nachweisen. Sie spielen eine inhibitorische Rolle bei der LPS- induzierten Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  Produktion.

Es ist noch wenig über die Produktion und den Wirkmechanismus dieser Rezeptoren bekannt, so dass auch hier eine mögliche Ursache in der gezielten Immunmodulation bei Erkennung unterschiedlicher LPS-Sorten liegen könnte.

In dieser Studie werden verschiedene, laborchemisch hergestellte Lipopolysaccharid-Sorten verwendet. Es wäre fortführend ebenso interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen die vollständig intakten Bakterien der verschiedenen Stämme auf die Mediatorausschüttung haben.

Es könnte sein, dass artspezifische Bakterienbestandteile, unabhängig von der Lipopolysaccharid- Region, erkannt werden und so immunrelevant werden.

Selbst bei der Herstellung der Lipopolysaccharid- Moleküle können zwischen verschiedenen Chargen Unterschiede auftreten. 2001 untersuchten Netea et al. die Signalwege von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* und postulierten, dass quantitative oder qualitative Unterschiede innerhalb der Proteine, die mit dem Endotoxin in Verbindung stehen und bei der Herstellung an dem Molekül verbleiben, ursächlich für unterschiedliche Reaktionen sein könnten.

Das Immunsystem weist eine Komplexität auf, welche die Entwicklung eines effektiven Therapeutikums im Kampf gegen die Sepsis, nahezu unmöglich macht. Diese Erkrankung ist nicht durch die alleinige Blockade oder Beeinflussung eines bestimmten Teiles der Immunantwort zu bekämpfen.

Diese Arbeit erbringt den Beweis, dass die Lipopolysaccharide verschiedener Bakterienstämme einen unterschiedlich starken und selektiven Einfluss auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren nehmen.

Es ist sinnvoll, die direkte Beziehung zwischen einem vorhandenen Keim oder Bakterium und dem daraus resultierenden Zytokinmilieu mehr in bestehende Sepsis-Scores einzubeziehen. Nur so können genauere Aussagen über den möglichen Verlauf der Erkrankung getroffen werden.

Auch bei Verwendung von Tiermodellen und grundlegenden Sepsisstudien in vitro sind die bakterienspezifischen Unterschiede hinsichtlich des Zytokinmilieus und dessen zeitlichem Verlauf zu beachten. Die unterschiedlichen Effekte können einen signifikanten Einfluss auf die Interpretation von Daten ausüben.

Bevor In-vivo- Experimente begonnen werden, könnte die Durchführung von umfassenden Ex-vivo- Vollblut-Untersuchungen überaus nützlich sein, um die für die jeweilige Fragestellung sinnvollste Lipopolysaccharid-Sorte und den besten Zytokin-Bestimmungszeitpunkt festzulegen.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass Studien mit ähnlicher Fragestellung, die jedoch mit unterschiedlichen Lipopolysacchariden arbeiten, hinsichtlich ihrer Ergebnisse nicht vergleichbar sind.

## 5 Zusammenfassung

---

Die vorliegende Studie untersucht den stimulierenden Effekt gereinigter Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* auf die Produktion der Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-10 (IL-10) und MCP-1 in Vollblut-Proben. Diese Effekte werden mittels ELISA gemessen.

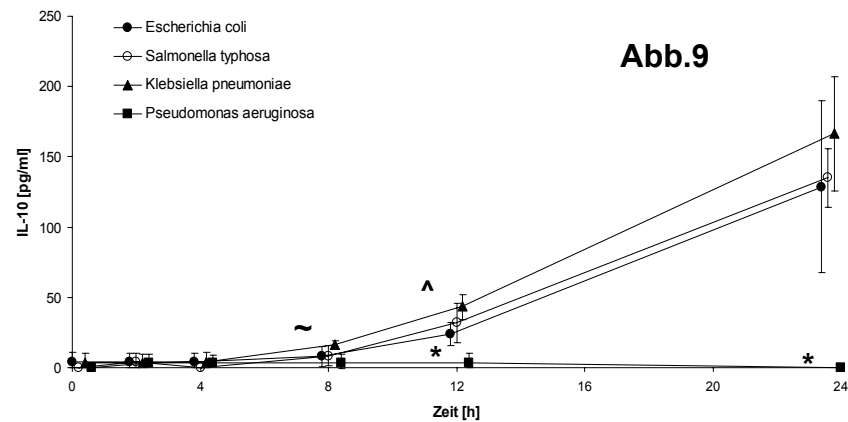
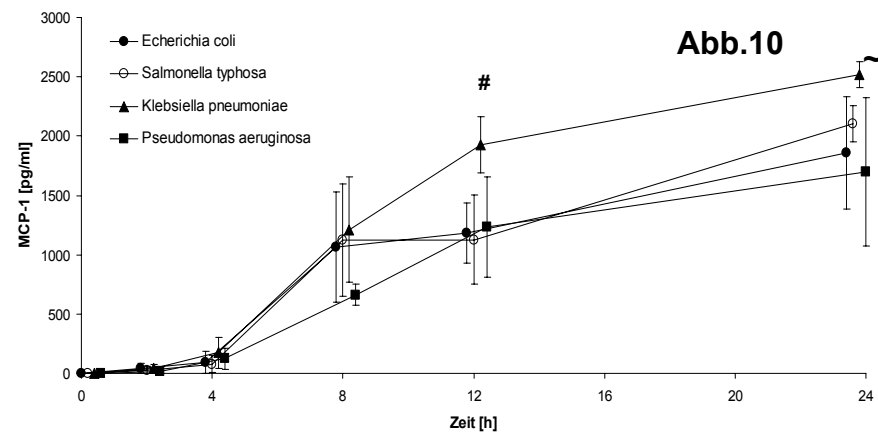
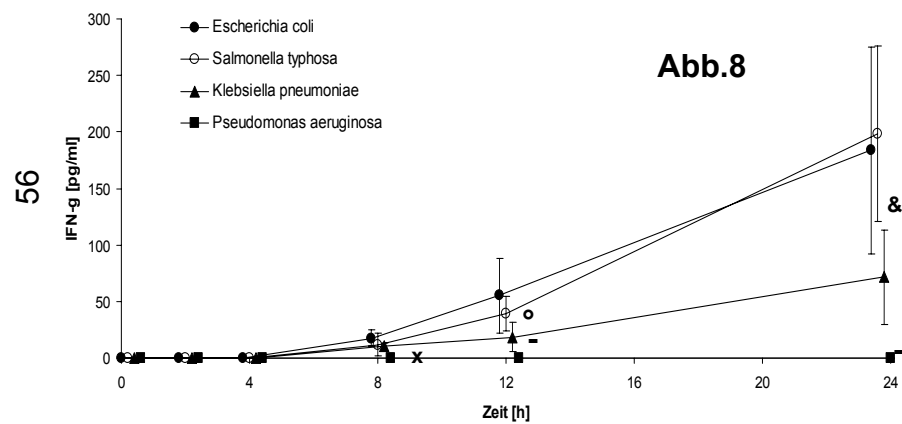
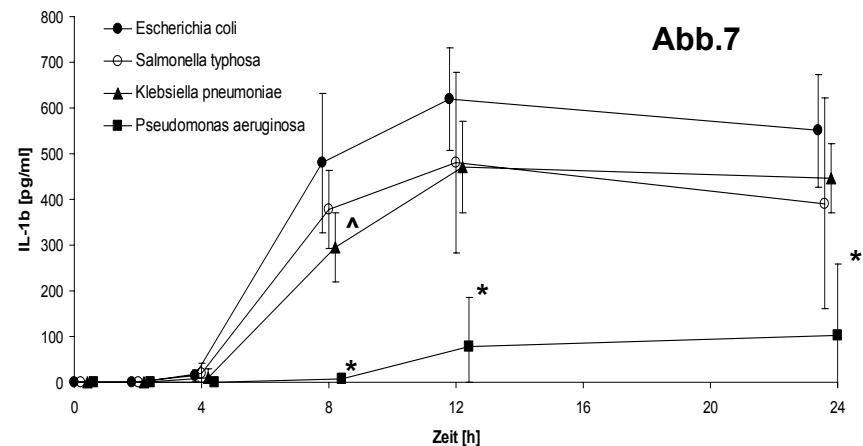
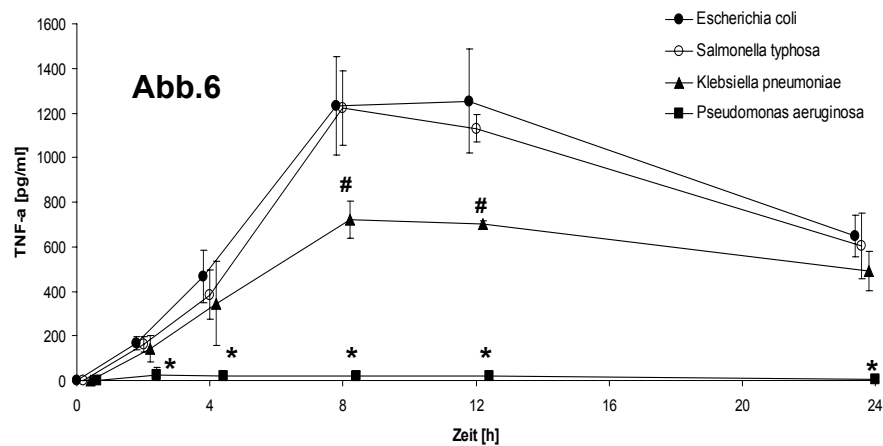
Aus der Inkubation von 0,5ml Vollblut mit 10ng/ml *E. coli* und *S. thyphosa* resultierte eine zeitabhängige Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 und MCP-1. *K. pneumoniae* hingegen zeigt hauptsächlich Effekte auf IL-1 $\beta$ , IL-10 und MCP-1 und weniger starke auf TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Das LPS von *P. aeruginosa* zeigt in Bezug auf die Produktion von MCP-1 ähnlich starke Effekte wie die anderen LPS-Sorten, die Stimulation der anderen Zytokine bleibt jedoch aus.

Zusätzlich können weitere Effekte der verschiedenen LPS-Präparate hinsichtlich der Mediator - Produktion über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgezeigt werden. Hierzu wird mit 0,1ng bzw. 1000ng LPS pro ml stimuliert. Diese Dosis-Antwort-Kurven werden mit LPS von *E. coli*, *S. thyphosa* und *K. pneumoniae* bei allen Mediatoren erzielt. Die Ausnahmen stellen IL-1 $\beta$  und MCP-1 dar.

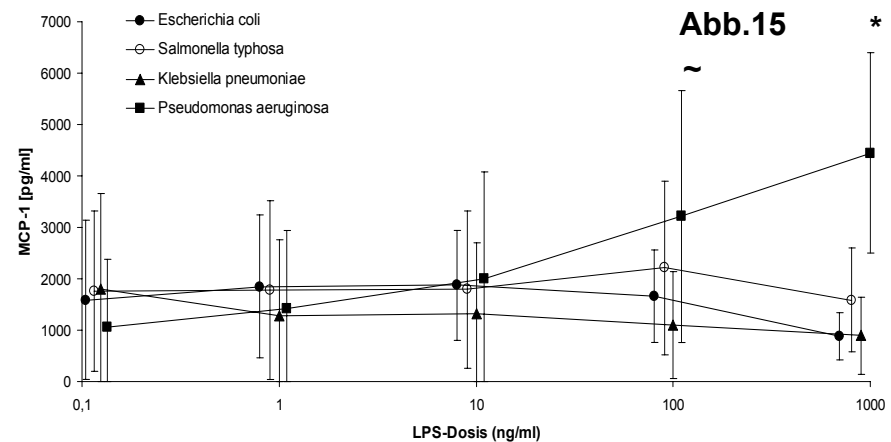
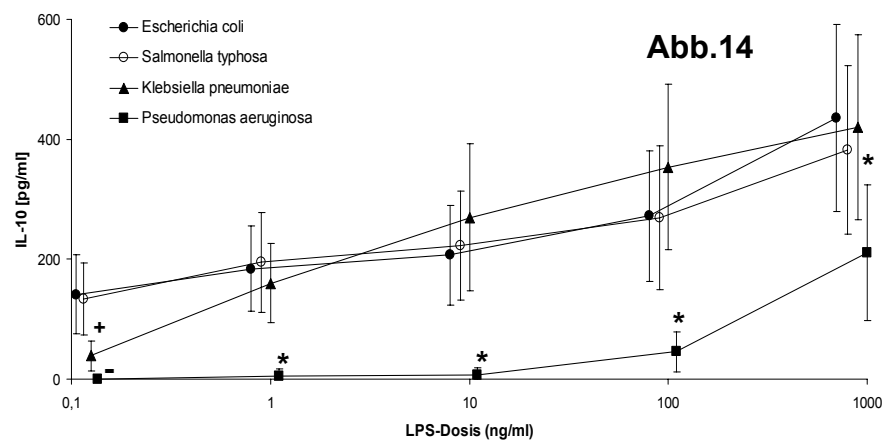
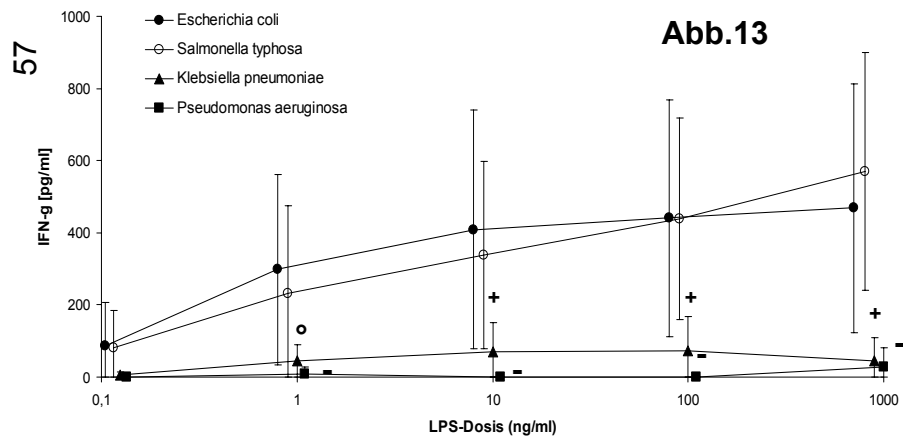
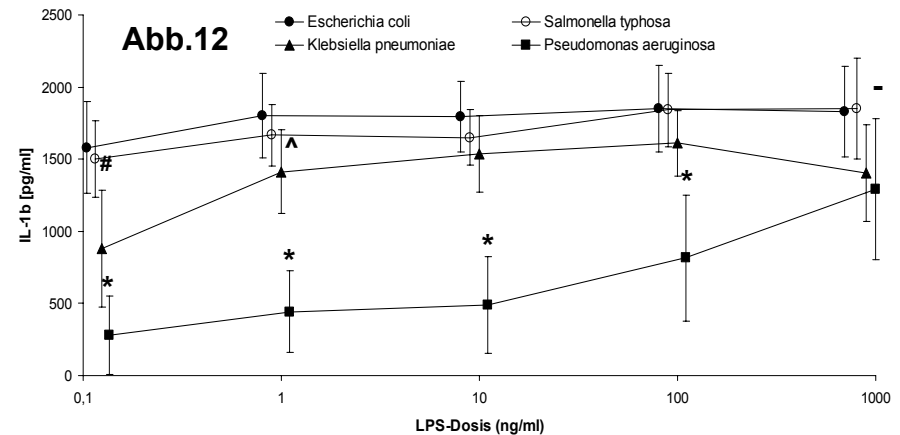
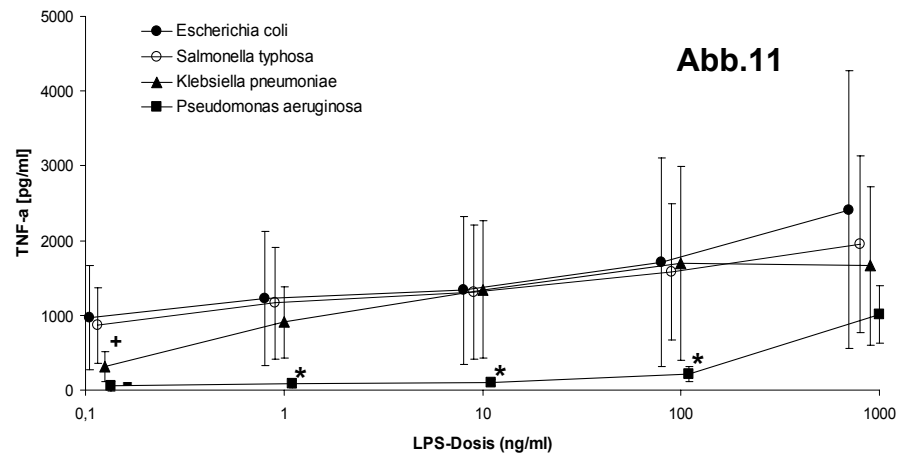
Der auffälligste Unterschied zwischen den einzelnen Sorten ist die Fähigkeit des LPS von *Pseudomonas aeruginosa*, einen ausgeprägten Dosis-Effekt auf MCP-1 auszuüben, trotz seines sehr schwachen Stimulationsvermögens auf die anderen Zytokine.

Diese Daten zeigen, dass die bakterielle Herkunft der LPS-Präparate eine wichtige Rolle bei der Produktion von Entzündungsmediatoren spielt.

Ferner könnte der starke selektive Dosis-Effekt von *P. aeruginosa* auf die MCP-1 Produktion das Übergewicht der übermäßigen Infiltration von Entzündungszellen bei Krankheiten wie z.B. zystischer Fibrose erklären.







### 6.3 Diagramm-Legende

#### Abbildung 6 - 10

Effekt von 10 ng/ml LPS auf die Zytokinproduktion in Voll-Blut-Proben innerhalb von 24h. 0,5 ml der menschlichen Voll-Blut-Proben wurden mit 10 ng/ml LPS von vier verschiedenen Bakterienstämmen behandelt und die Überstände wurden auf deren Mediatorproduktion mittels ELISA untersucht.

Die Daten wurden als gerundete Werte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Diese Werte sind durch folgende Zeichen erkenntlich:

- \* Pseudomonas aeruginosa vs. alle
- # Klebsiella pneumoniae vs. alle
- Pseudomonas aeruginosa vs. E.coli und S.typhosa
- + Klebsiella pneumoniae vs. E.coli und S.typhosa
- ^ Klebsiella pneumoniae vs. E.coli und P.aeruginosa
- ~ Pseudomonas aeruginosa vs. K.pneumoniae
- ° Klebsiella pneumoniae vs. E.coli
- × Pseudomonas aeruginosa vs. E.coli
- & Klebsiella pneumoniae vs. S.typhosa

## Abbildung 11 – 15

Die Daten für die Dosis-Antwort-Kurven der Zytokinproduktion für die verschiedenen Bakterien-LPS-Sorten in Voll-Blut-Proben über 24h wurden als gerundete Werte  $\pm$  Standardabweichung gegeben. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

Diese Werte sind durch folgende Zeichen erkenntlich:

- \* Pseudomonas aeruginosa vs. alle
- # Klebsiella pneumoniae vs. alle
- Pseudomonas aeruginosa vs. E.coli und S.typhosa
- + Klebsiella pneumoniae vs. E.coli und S.typhosa
- ^ Klebsiella pneumoniae vs. E.coli und P.aeruginosa
- ~ Pseudomonas aeruginosa vs. K.pneumoniae
- ° Klebsiella pneumoniae vs.E.coli
- × Pseudomonas aeruginosa vs. E.coli
- & Klebsiella pneumoniae vs. S.typhosa

Bakterien Sorte = E. coli																								
Zeit [h]	0				2				4				8				12				24			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-gamma [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,5	12,8	17,7	6,8	92,8	32,9	55,5	32,6	289,6	127,7	183,7	91,8
IL-10 [pg/ml]	11,8	0,0	3,9	6,8	11,5	0,0	3,8	6,7	11,3	0,0	3,8	6,5	13,6	0,0	7,9	7,0	31,0	15,0	23,9	8,2	193,7	72,5	128,8	61,1
IL-1beta [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,3	0,0	14,3	12,9	571,5	303,4	480,0	152,9	715,9	495,7	618,8	112,4	684,8	442,7	550,5	123,2
MCP-1 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	85,5	0,0	45,7	43,0	197,0	24,2	93,8	91,1	1588,7	694,9	1063,4	467,0	1472,5	1008,9	1181,3	253,6	2270,6	1344,3	1862,6	472,9
TNF-alpha [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	197,9	144,0	170,3	27,0	588,2	363,8	467,5	113,2	1484,3	1085,5	1235,4	217,1	1472,9	1017,1	1256,9	228,8	752,9	595,1	649,8	89,3

Bakterien Sorte = S. typhosa																								
Zeit [h]	0				2				4				8				12				24			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-gamma [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0	0,0	11,9	10,3	55,6	25,1	38,9	15,5	283,9	131,7	198,6	77,7
IL-10 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	0,0	3,9	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	12,8	0,0	8,3	7,2	46,6	18,8	32,1	14,0	159,2	121,2	135,3	20,8
IL-1beta [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,1	0,0	19,8	21,7	428,8	279,2	378,3	85,8	706,3	336,2	481,2	197,6	648,4	206,3	390,9	229,9
MCP-1 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	68,3	0,0	22,8	39,4	160,3	31,6	78,8	70,8	1648,1	727,0	1123,1	473,9	1562,2	880,7	1127,7	377,4	2258,0	1955,2	2103,3	151,5
TNF-alpha [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	198,9	136,0	164,2	32,0	471,9	272,0	387,4	103,4	1392,9	1058,7	1224,5	167,1	1182,8	1060,0	1134,6	65,6	725,8	441,4	608,6	148,7

Bakterien Sorte = Klebsiella pneumoniae																								
Zeit [h]	0				2				4				8				12				24			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-gamma [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,6	6,6	10,2	3,2	32,6	7,6	18,6	12,8	119,1	40,7	71,5	41,8
IL-10 [pg/ml]	11,2	0,0	3,7	6,5	10,5	0,0	3,5	6,1	12,2	0,0	4,1	7,0	18,6	13,6	16,4	2,6	49,3	33,3	43,4	8,8	213,4	142,6	166,4	40,8
IL-1beta [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	31,0	0,0	10,3	17,9	381,5	239,6	295,7	75,5	566,2	367,4	471,7	99,8	518,7	368,3	447,2	75,5
MCP-1 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	67,0	0,0	40,1	35,4	271,4	28,0	176,5	130,3	1564,8	713,3	1211,8	444,1	2097,5	1659,9	1929,5	235,8	2593,8	2390,0	2516,0	110,1
TNF-alpha [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	207,3	106,3	146,9	53,3	563,3	227,8	348,4	186,6	808,3	654,1	724,9	77,8	710,6	696,0	704,3	7,5	590,3	435,2	492,6	85,0

Bakterien Sorte = Pseudomonas aeruginosa																								
Zeit [h]	0				2				4				8				12				24			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-gamma [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-10 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	10,3	0,0	3,4	6,0	10,1	0,0	3,4	5,8	10,7	0,0	3,6	6,2	11,2	0,0	3,7	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-1beta [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,9	0,0	7,3	12,7	201,6	0,0	77,9	108,3	281,9	0,0	102,9	155,6
MCP-1 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	47,5	0,0	15,8	27,4	218,0	42,8	124,4	88,3	724,9	563,9	663,1	86,8	1586,0	764,5	1233,6	423,0	2126,1	981,5	1699,8	625,7
TNF-alpha [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	62,2	9,5	29,1	28,8	44,6	9,5	23,2	18,8	43,4	14,3	24,6	16,3	35,0	10,2	20,8	12,8	17,7	0,0	9,5	8,9

Bakterien Sorte = E.coli																				
Dosis [ng/ml]	0,1				1				10				100				1000			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-y [pg/ml]	309,6	0,0	86,9	118,8	709,1	17,8	298,6	263,9	797,2	44,5	409,1	331,9	878,8	57,2	440,7	327,9	941,5	69,8	468,2	345,0
IL-10 [pg/ml]	217,5	35,1	141,3	65,6	272,1	55,3	184,2	71,6	313,4	71,6	206,9	83,2	435,4	115,9	271,9	108,5	601,2	194,7	435,4	155,4
IL-1beta [pg/ml]	2032,5	1160,7	1581,3	315,3	2234,6	1462,9	1800,9	293,0	2162,4	1475,2	1797,1	243,4	2319,1	1491,0	1851,6	300,8	2349,5	1401,4	1829,9	316,6
MCP-1 [pg/ml]	4625,7	493,4	1580,6	1549,7	4353,4	433,9	1850,0	1396,1	3568,3	576,4	1870,6	1073,0	2877,2	555,0	1662,7	893,7	1567,5	342,1	880,9	458,8
TNF-a [pg/ml]	2293,1	288,2	968,4	704,6	2981,8	555,6	1222,2	900,3	3243,8	480,7	1332,3	993,2	4491,8	812,6	1712,2	1394,2	5855,9	1245,6	2414,5	1857,9

Bakterien Sorte = S.typhosa																				
Dosis [ng/ml]	0,1				1				10				100				1000			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-y [pg/ml]	268,0	0,0	79,9	104,6	643,4	23,4	231,5	243,5	735,4	48,2	337,4	259,4	763,6	90,5	439,1	278,9	1007,8	130,8	569,6	330,4
IL-10 [pg/ml]	192,7	34,2	133,5	59,9	297,6	69,4	194,7	82,5	337,0	83,0	222,9	90,6	437,9	108,8	268,8	119,8	578,0	185,5	382,0	140,3
IL-1beta [pg/ml]	1951,0	1186,4	1502,9	264,7	2019,5	1405,8	1667,1	211,4	2023,5	1462,7	1649,7	193,0	2257,4	1583,1	1840,1	255,2	2299,6	1519,3	1850,5	352,5
MCP-1 [pg/ml]	4836,6	547,2	1760,8	1561,9	5277,5	632,6	1786,9	1739,1	4834,8	796,8	1791,7	1528,1	5407,1	946,3	2214,9	1689,6	3565,2	908,0	1589,3	1004,6
TNF-a [pg/ml]	1787,0	334,3	864,4	508,8	2549,8	418,4	1161,3	746,6	3082,0	662,4	1310,9	902,9	3339,1	860,2	1575,9	911,3	4018,8	1089,3	1955,1	1185,9

Bakterien Sorte = K.pneumoniae																				
Dosis [ng/ml]	0,1				1				10				100				1000			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-y [pg/ml]	22,5	0,0	5,7	9,5	107,7	0,0	44,2	45,0	203,7	0,0	70,8	81,3	221,9	0,0	73,0	95,0	136,7	0,0	44,1	63,7
IL-10 [pg/ml]	64,2	0,0	39,0	24,7	252,6	59,9	160,2	65,5	413,5	97,9	269,6	122,4	578,5	144,3	353,6	138,1	654,2	169,8	419,8	154,9
IL-1beta [pg/ml]	1351,8	327,9	880,7	403,6	1777,9	937,1	1412,9	291,1	1935,5	1190,0	1537,0	263,1	2010,7	1356,2	1612,0	226,1	1918,7	968,5	1404,3	333,0
MCP-1 [pg/ml]	5488,1	255,8	1802,0	1865,2	4293,1	508,4	1283,7	1477,5	4107,4	611,0	1322,3	1371,3	3218,4	513,8	1100,7	1043,5	2412,9	428,4	894,6	750,3
TNF-a [pg/ml]	559,2	94,1	307,7	198,6	1685,0	381,8	908,0	478,2	3130,6	615,9	1344,1	915,4	4211,8	641,1	1695,9	1300,2	3722,5	698,3	1660,1	1063,6

Bakterien Sorte = P.aeruginosa																				
Dosis [ng/ml]	0,1				1				10				100				1000			
	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD	Max	Min	Mean	SD
IFN-y [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	48,2	0,0	8,0	19,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	129,6	0,0	29,2	51,0
IL-10 [pg/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	27,2	0,0	5,8	10,9	28,6	0,0	7,4	12,1	100,2	10,3	45,9	33,7	340,9	74,3	210,4	113,1
IL-1beta [pg/ml]	757,0	46,1	278,6	271,6	866,7	111,8	443,1	280,7	1024,3	164,0	489,4	336,0	1526,6	411,4	815,1	436,5	1985,6	845,2	1289,3	488,5
MCP-1 [pg/ml]	3736,8	331,4	1050,3	1325,4	4484,3	367,4	1410,2	1523,8	6091,3	458,0	1992,3	2081,9	7960,8	1144,9	3212,9	2444,6	6708,7	1367,5	4446,3	1954,2
TNF-a [pg/ml]	130,8	0,0	52,0	61,4	169,6	35,1	81,0	53,1	164,6	51,8	99,8	40,3	377,7	73,3	210,3	99,4	1324,0	318,4	1012,8	380,2

## 8 Literaturverzeichnis

---

Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL. Drotrecogin alfa (aktivated) for adults with severe sepsis and low risk of death. *N Engl J Med* 2005; 353: 1332-1341

Alexander C, Rietschel ETh. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research* 2001; 7: 167-192

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 Jul; 29: 1303-1310

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705

Baggiolini M. Reflections on chemokines. *Immunol Rev* 2000; 177: 5-7

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104

Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent Efficacy of Antibody to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Intravascular and Peritonitis Models of Sepsis. *The J of Infect Dis* 1991; 163: 83-88

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF. Efficacy And Safety Of Recombinant Human Activated Protein C For Severe Sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709

Beutler B, Milsrk IW, Cerami AC. Passive Immunisation Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effect of Endotoxin. *Science* 1985; 229: 869-871

Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252

Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrom. *J Pathol* 2004; 202: 145-156

Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 559-573

Blackwell TS, Christman JW Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110-117

Bloos F, Reinhart K. Anti-inflammatory treatment in sepsis. *Der Chirurg* 2002; 73: 1087-1092

Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-469

Brandl K, Glück T, Salzberger B, Hartmann P, Falk W. Ein Komplex aus löslichem TLR4 und MD-2 hemmt LPS-Aktivierung in vitro- eine neue Therapieoption für die Sepsis? *Medizinische Klinik* 2005; 100: 46

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock - A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU group for severe sepsis. *JAMA* 1995; 274: 947-968

Cumumano V, Tufano MA, Mancuso G, Carbone M, Rossano F, Fera MT, Ciliberti FA, Ruocco E, Merendino RA, Teti G. Porins of pseudomonas aeruginosa induce release of tumor necrosis faktor alpha and interleukin-6 by human leukocytes. Infection and Immunity 1996; 65: 1683-1687

Reinhart K, Brunkhorst FM, Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. Leitlinie Diagnose und Therapie der Sepsis. Methodenreport. AWMF- Leitlinien- Register 2005; Nr. 079/001

a) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000; 118: 503-508

b) Dinarello CA. The Role of the Interleukin-1-Receptor Antagonist in Blocking Inflammation Mediated by Interleukin-1  
The new Engl J of Med 2000; 343: 732-734

Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor abd treatment of the septic shock syndrome. J Infect Dis 1991; 163: 1177-1184

Dinarello CA. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock. Chest 1997; 112: 321S-329S

Dunican AL, Leuenroth SJ, Grutkoski P, Ayala A, Simms HH. TNF- alpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 produktion. Shock 2000; 14: 284-288; discussion 288-289

Epelman S, Bruno TF, Neely GG, Woods DE, Mody CH.  
Pseudomonas aeruginosa Exoenzyme S Induces Transcriptional Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. Inf and Imm 2000; 68: 4811-4814

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. Crit Care Med 1998; 26: 2078-2086



Gauer U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1403-1408

Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 2002; 3: 354-359

Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CRH. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 1991; 352: 342-352

Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort der Sepsis. *Der Anästhesist* 2004; 53: 10-28

Houle M, Thivierge M, Le Gouill C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. IL-10 up-regulates CCR5 gene expression in human monocytes. *Inflammation* 1999; 23: 241-251

Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikachoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signalling. *J Immunol* 2000; 165: 6682-6686

Jähne J. Neues zur abdominalen Sepsis. *Der Chirurg* 2005; 76: 827-828

Janeway CA, Medzhitov R, Preston-Hurlburt P. A human homologue of the Drosophila Toll proteins signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt P, Hoshino K and Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in

aktivation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167: 5887

Kobayashi Y, Miyaji H, Watanabe H, Umezu H, Hasegawa G, Abo T, Arakawa M, Kamata N, Suzuki H, Kodama T, Naito M. Role of macrophage scavenger receptors in endotoxin shock. *J Pathol* 2000; 192: 263-272

Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signalling. *Cell* 2002; 110: 191-202

Krause M, Gubler J. Systemische Infektionen. In: Thieme Innere Medizin 1999, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1807-1814

Lamy M and Deby-Dupont G. Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch?  
*Intensiv Care Med* 1995; 21 Suppl 2: 250-257

Luster A. Chemokines- Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation.  
*The New Engl J of Med* 1998; 338: 436- 444

Mathiak G, Kabir K, Grass G, Keller H, Steinringer E, Minor T, Rangger C, Neville LF. Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *Inter Int J Mol Med* 2003 Jan; 11: 41-44.

Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992; 12: 17-46

Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993; 151: 1548-1561

Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. Langerhans Cells Transport Leishmania Major from the Skin to the Draining Lymph Node for the Presentation to Antigen-specific T-Cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1595-1601

Muraille E, Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm .  
*Scand J Immunol* 1998; 47: 1-9

Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998 Jun 15; 187: 2097-101

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002 Jul; 3: 667-672. Epub 2002 Jun 10.

Netea G, Kullberg BJ, Joosten LAB, Sprong T, Verschueren I, Boerman OC, Amiot F, van den Berg WB, van der Meer JWM. Lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2529-2538

Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, Moore T, Zeng X, Tateda K, Standiford TJ  
Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 2002; 69: 1394-1401

Rabinovici R, Feuerstein G, Abdulla F, Whiteford M, Borboroglu P, Sheikh E, Phillip DR, Ovadia P, Bobroski L, Bagasra O, Neville LF.  
Locally Produced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Mediates Interleukin-2 Lung Injury.  
*Circulation Research* 1996; 78: 329-335

Rietschel E Th, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppkow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schuhmann RR. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification.

Curr Top Microbiol Immunol 1996; 216: 39-81

Re F, Stromminger JL. Monomeric recombinant MD-2 binds Toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharides responsiveness. J Biol Chem 2002; 277: 23427-23432

Re F, Stromminger JL. Separate functional domains of human MD-2 mediate Toll-like receptor 4 binding and lipopolysaccharides responsiveness. J Immunol. 2003; 171: 5272-5276

Salvo I, de Ciano W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfer A, Montani C, Magni E. The SEPSIS study group: The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock.

Intensive Care Med, 1995; 21: 244-249

Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. Eur J Health Econom, 2002; 3: 77-82

Schrohm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MHJ, Rietschel E Th, Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. Eur J Biochem 2000; 267: 2008- 2013

Siegel JP. Assessing the use of activated protein C in the treatment of severe sepsis. N Engl J Med 2002 Sep 26; 347: 1030-1034.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharides responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med 1999; 189: 1777-1782

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516-3521

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.

Takeda K, Akira S. TLR signalling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9

Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994; 1: 229-246

Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 81-89

Tracy K, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330: 662- 664

van Amersfoort ES, van Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clinical Microbiol.* 2003; 16: 379- 414

Vincent JL. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg* 2000; 55: 79-87

Wahl HG, Herzum I, Renz H. Sepsis und Sepsismarker-Update. *J Lab Med* 2003; 27: 431-439

Warren HS, Suffredini AF, Eichacker PQ, Munford RS. Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med* 2002 Sep 26; 347: 1027-1030

Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signalling. *Mol Immunol*. 2004; 40: 861-868.

Zanetti G, Heumann D, Gerain J, Kohler J, Abbet P, Barras C, Lucas R, Glauser MP, Baumgartner JD. Cytocine Production After Intravenous or Peritoneal Gram-Negative Bacterial Challenge In Mice.

*The J of Immunol* 1992; 148: 1890- 1897

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.- Doz. Dr. med. Günther Mathiak für die Überlassung des Themas sowie die stets freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit und Hilfestellung.

Während der gesamten Laborarbeiten und wissenschaftlichen Hintergrundforschungen stand mir Herr Dr. med. Koroush Kabir stets geduldig und lehrreich zur Seite. Hierfür möchte ich mich im Besonderen bedanken und wünsche ihm für seine eigene wissenschaftliche Zukunft alles Gute und viel Erfolg.

Weiterhin danke ich den Probanden, die sich zur Gewinnung der Vollblut-Proben zur Verfügung gestellt haben.

Meine treibende Kraft war und ist mein Lebensgefährte und Kollege Herr Stephan Düren, Assistenzarzt der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Mechernich.

Meinen Eltern und meiner Schwester verdanke ich meinen gesamten Werdegang. Sie haben mir durch ihre immerwährende Unterstützung und den liebevollen familiären Rückhalt meinen Lebensweg ermöglicht.

Aus diesem Grund möchte ich meine Dissertationsarbeit meiner Familie widmen.